

127  
Translation

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference AKK-37-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04792	International filing date (day/month/year) 17 July 2000 (17.07.00)	Priority date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 25/16		
Applicant ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 July 2000 (17.07.00)	Date of completion of this report 27 October 2000 (27.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04792

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).  
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_  
☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04792

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Claims 1 to 24

Document 1 [JP, 10-142177, A (Bunshi Bio Photonics Kenkyusho K.K.), 29 May 1998 (29.05.98), full text, Figs. 1 to 4] represents the general state of the art in the related technical field. None of the documents cited in the ISR describes or even suggests (1) a substance measuring method including (a) a step that prepares a test sample by mixing a reagent with a sample originating in biological components and allowing them to react so as to produce, without inducing hydrogen peroxide, a reaction product in the amount of the aforementioned substances having a different absorption wavelength than the aforementioned substances and (b) a photothermal converting detection step or (2) a substance measuring method including (a) a sample preparing step in which a test sample is prepared by mixing a reagent with a blood sample showing chylification and (b) a photothermal converting detection step.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-142177, A (Bunshi Bio Photonics Kenkyusho K.K.), 29 May, 1998 (29.05.98), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 September, 2000 (14.09.00)Date of mailing of the international search report  
26 September, 2000 (26.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.





A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2000年  
日本国登録実用新案公報 1994-2000年  
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-142177, A (株式会社分子バイオテクノス研究所) 29. 5月. 1998 (29. 05. 98) 全文, 図1-4 (ファミリーなし)	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 14. 09. 00

国際調査報告の発送日 26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
野村 伸雄



2J 9311

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 AKK-37-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04792	国際出願日 (日.月.年) 17.07.00	優先日 (日.月.年) 16.07.99
出願人(氏名又は名称) 旭化成工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 9 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-142177, A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 29. 5月. 1998 (29. 05. 98) 全文, 図1-4 (ファミリーなし)	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 伸雄

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J 9311



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MORI, Tetsuya  
Nichiei Kokusai Tokkyo Jimusho  
Muraki Building, 8th Floor  
7, Kanda-Kajicho 3-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0045  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2001 (21.02.01)	To:
Applicant's or agent's file reference AKK-37-PCT	
International application No. PCT/JP00/04792	IMPORTANT NOTIFICATION
	International filing date (day/month/year) 17 July 2000 (17.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA 2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku Osaka-shi, Osaka 530-8205 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No. 03-3507-7668	
	Facsimile No. 03-3593-2463	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA 2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku Osaka-shi, Osaka 530-8205 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No. 03-3507-7668	
	Facsimile No. 03-3593-2463	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Shinji IGARASHI
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 25 January 2001 (25.01.01)	
International application No.: PCT/JP00/04792	Applicant's or agent's file reference: AKK-37-PCT
International filing date: 17 July 2000 (17.07.00)	Priority date: 16 July 1999 (16.07.99)
Applicant: KITAGUCHI, Nobuya et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
17 July 2000 (17.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 10 NOV 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 AKK-37-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04792	国際出願日 (日.月.年) 17.07.00	優先日 (日.月.年) 16.07.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> G01N 25/16		
出願人(氏名又は名称) 旭化成工業株式会社		


1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.07.00	国際予備審査報告を作成した日 27.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  野村 伸雄  電話番号 03-3581-1101 内線	2 J 9311



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-24 有  
請求の範囲 無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1-24 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1-24 有  
請求の範囲 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-24

文献1: JP、10-142177、A (株式会社分子バイオホトニクス研究所)、  
29.5月.1998 (29.05.98)、全文、図1-4

は、当該技術分野における一般的技術水準を示す文献であって、生体成分由来試料と測定試薬とを混合し反応させ、過酸化水素を誘導することなく、前記物質とは吸収波長が異なる反応生成物を前記物質の量だけ生成させて、測定試料を調整する工程と、光熱変換検出工程とを備えた物質測定方法、及び乳びを呈する血液試料と測定試薬とを混合して測定試料を調製する試料調製工程と、光熱変換検出工程とを備えた物質の測定方法に関しては、国際調査報告で列記した文献のいずれにも、記載も示唆もされていない。





(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504732

(43) 公表日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI
B 0 4 B 5/00		9344-4D	B 0 4 B 5/00 Z
G 0 1 N 1/10		0271-2J	G 0 1 N 1/10 H
1/28		0273-2J	21/07
21/07		0271-2J	1/28 J

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願平7-508331  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月1日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)3月1日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/10299  
 (87) 国際公開番号 WO95/06870  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月9日  
 (31) 優先権主張番号 08/115, 162  
 (32) 優先日 1993年9月1日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 アバクシス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国94089 カリフォルニア州,  
 サニーベール, チェサピーク テラス  
 1320  
 (72) 発明者 スケムブリ, キャロル ティー.  
 アメリカ合衆国 94403 カリフォルニア  
 州サン マテオ, マーシャル アベニュー  
 3912  
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54) 【発明の名称】 簡易入口チャンネル

## (57) 【要約】

本発明は、液体、典型的には希釈血漿のような生物学的試料をローター (52) 内部の換気されていないチャンパへ変更されていないチャンネル (60) を通して導入するための遠心式ローター (52) を提供する。この換気されていないチャンパは典型的にクヴェット (62) とされ、これは生物学的試料の分析のために必要な試剤を収容している。変更されていない入口チャンネル (60) は、ローター (52) の回転時に、入口チャンネル (60) を通してチャンパ内に液体が流入するにつれて、該チャンパからガスが入口チャンネル (60) を通して排出されるように、寸法決めされている。換気されていないチャンパ (62) から空気が排出されるようにする主な特徴は、入口チャンパの横断面積がそのチャンネル内を流れる液体の横断面積よりも大きいことである。

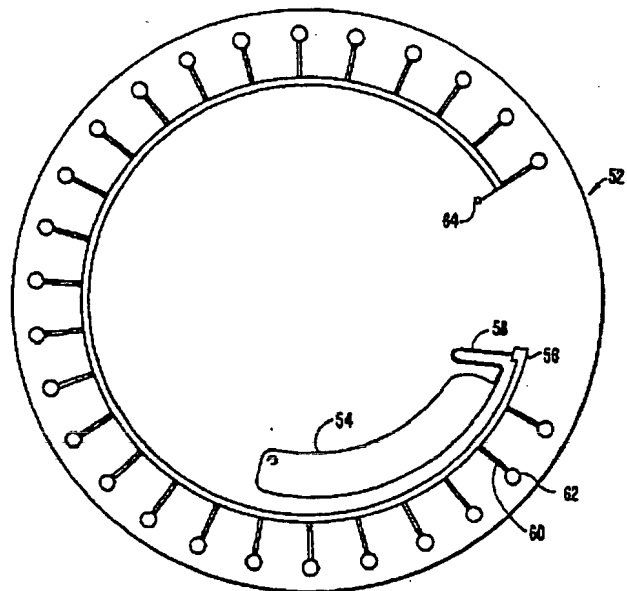


FIG. 1.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-501340

(43) 公表日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
G 0 1 N 35/00		0271-2 J	G 0 1 N 35/00	D
21/07		0273-2 J	21/07	
33/48		0276-2 J	33/48	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願平8-501264  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 6月5日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996) 12月6日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/07145  
 (87) 国際公開番号 WO95/33986  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995) 12月14日  
 (31) 優先権主張番号 08/254, 406  
 (32) 優先日 1994年6月6日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, J P

(71) 出願人 アバクシス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国94089 カリフォルニア州,  
 サニーベール, チェサピーク テラス  
 1320  
 (72) 発明者 コブ - シル, アンヌ アール,  
 アメリカ合衆国 94028 カリフォルニア  
 州ポートラ バレイ, ミノカ ロード 30  
 (72) 発明者 シェムブリ, キャロル ティー,  
 アメリカ合衆国 94403 カリフォルニア  
 州サン マテオ, マーシャル アベニュー  
 3912  
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54) 【発明の名称】 測定精度を改善するための改良サイホン

(57) 【要約】

この発明は、ロータの中の室に予め測定した量の液体を送り出すための遠心力ロータを提供する。特に、このロータは、予め測定した量の液体をこのロータの第1室と第2室(136)の間に送り出すためのサイホン(134)を含む。この発明のサイホン(134)は、この第1室上のこのサイホンの入口(138)が第2室(136)上のサイホン出口(139)の半径方向に外にあるように設計されている。この第1室は、このサイホン出口(139)の半径方向位置と同じ高さへ注ぐ。

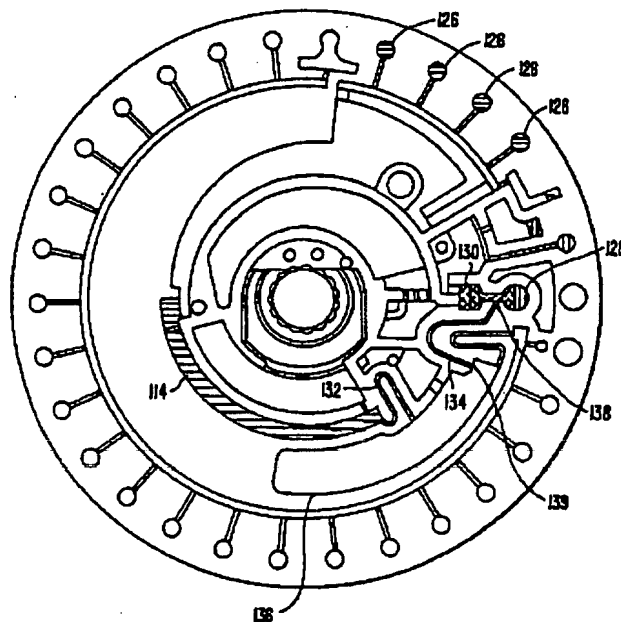


FIG. 10.



## 明 細 書

物質の測定方法及び該測定方法に用いる測定試薬

## 5 技術分野

本発明は、微量検体中の物質を簡便に測定する方法に関する。また、該測定方法において用いる測定試薬に関する。

## 背景技術

- 10 医療診断に必要な測定を患者近傍で行うベッドサイド診断用の分析（P O C (point of care ) 分析）や、河川や廃棄物中の有害物質の分析を河川や廃棄物処理場等の現場で行うことや、食品の調理，収穫，輸入の各現場における汚染検査等のような、分析・測定が必要とされる現場もしくは現場の近傍で分析・測定を行うこと（以下、「P O C 分析
- 15 等」と総称する）の重要性が注目されている。そして、近年、このようなP O C分析等に適した測定法や装置の開発が重要視されつつある。

- このようなP O C分析等においては、安価で簡便且つ短時間で測定できることが要求されている。また、医療診断のための分析に対しては、分析時間の短縮や、分析に必要な検体（血液等）の量及び測定後の廃棄物
- 20 物の量の微量化が求められている。

上記のようなP O C分析等における測定法には、通常、吸光度法が採用されることが多い。吸光度測定の際の光路長は、測定感度の点から1 c mが標準であるが、数ミリメートル程度まで短くしても、感度が若干低下するものの測定は可能である。

- 25 このような短い光路長での吸光度測定としては、例えば、日本国特許公表公報 平成10年第501340号や日本国特許公表公報 平成9

年第504732号に記載のもの（以上2件はアバクシス社による出願）や、日本国特許公開公報 平成9年第196920号（免疫項目），日本国特許公開公報 平成8年第114539号（生化学項目），日本国特許公開公報 平成9年第196739号（溶解液先端検知），日本国特許公開公報 平成9年第138195号（多孔性材料の透過光測定による分析）に記載のもの（以上4件は日本メディフィジックス社による出願）がある。

しかしながら、検体量がさらに微量になると、ミリメートル単位の光路長を有する検出キュベット（セル）では容積が大きすぎて、セルの容積に試料量を合わせようとすると、試料中の検体の濃度が薄くなりすぎて分析できない場合がある。

このような問題を解決するために、 $\mu$ TAS（micro total analysis system）あるいはLab-on-Chipと総称される分析法の概念が提唱されている（Sensors and Actuators, B1(1990), 244-248, A. Manz 他）。これらのものは、従来利用されてきた分析装置を小型化し、且つ、数 $\mu$ mから数百 $\mu$ mの幅及び深さのキャピラリを有する数cm角程度の大きさのチップを用いて試料の分離や反応を行って、微量分析を簡便に行うことを目指している。

$\mu$ TASは、微量な試料でも分析可能な測定方法として研究が進められている（日本国特許公開公報 平成2年第245655号参照）。この $\mu$ TASは、10cmから数cm角程度以下のガラス、シリコン、有機ポリマー等のチップの表面に、深さ及び幅が数 $\mu$ mから数百 $\mu$ m程度の溝（キャピラリ）を設け、その中で試料の分離，反応さらには測定を行うものである。このようなマイクロチップを用いた場合には、検体量、分析に必要な試薬量，分析に用いた消耗品等の廃棄物，廃液の量がいずれも少なく済む上、分析に必要な時間もおおむね短時間で済むという

利点がある。

- しかしながら、上記のような溝を有するマイクロチップを使用した場合は、光路長を数 $\mu\text{m}$ から数百 $\mu\text{m}$ 程度しか取れないので、吸光度法では満足な測定ができない場合が多い。なぜなら、吸光度法は原理的に、
- 5 入射光と透過光との比を検出するものであるため、精度のよい結果を得るためには光路長を長くとる必要があるからである。

- そのため、マイクロチップ中の溝に、液の流れ方向（溝の長手方向）に対し垂直に光をあてるのではなく、液の流れ方向に沿って光を当てるという工夫もされているが（一般的な溝中の吸光度測定の例としては、
- 10 例えば、日本国特許公開公報 平成8年第304339号がある）、平面チップに形成された溝（キャピラリ）の場合、液の流れ方向での検出は容易ではなく、また、長光路を得るためマイクロチップ及び検出部の構造が複雑となる欠点を有する。

- また、微量成分の検出法としては、蛍光法や発光法も知られている。
- 15 しかし、測定試料中の測定対象物質（ヘモグロビン等）に直接又は間接に酵素や蛍光色素で標識した抗体などを結合させる必要があるので、検出のための反応がきわめて複雑になる。

- 一方、微量検体中の物質の別の検出法としては、励起光により試料を励起して、いわゆる熱レンズを形成させ、プローブ光によりその熱レンズの変化を測定する光熱変換検出法（熱レンズ検出法）が以前から知られている。例えば、日本国特許公開公報 昭和60年第174933号、
- 20 A. C. Boccara et. al., Appl. Phys. Lett. 36,130,1980、J. Liquid Chromatography 12, 2575-2585(1989)、日本国特許公開公報 平成10年第142177号（分子バイオホトニクス）、日本国特許公開公報
- 25 平成4年第369467号（横河電機株式会社）などに記載のものがあ  
る。

まず、光熱変換現象により形成される熱レンズを用いた検出法、すなわち光熱変換検出法（熱レンズ検出法）の原理を説明する。

5 溶液に溶解している測定対象物質が吸収する波長の光（励起光）を測定試料に照射する。すると、測定対象物質は励起光により励起され、熱を発生する（光熱変換効果）。ここでは、溶液中に存在する測定対象物質以外の夾雑物が、この励起光を吸収しないように、励起光の波長を選択することが重要である。

10 発生した熱は、励起光が照射された部分の近傍の溶媒に伝わり、局所的な密度変化、ひいては屈折率変化を引き起こす。このため、励起光を吸収する物質の存在下では、励起光を照射した部分はあたかも凹レンズが形成されたようになる。この凹レンズが形成された部分に、励起光の波長とは異なるプローブ光を照射する。プローブ光は熱レンズにより屈折するため、プローブ光を捕捉する受光素子が捉えるプローブ光の光量は、熱レンズが形成されることにより低下する。

15 光熱変換効果の度合いは測定対象物質の濃度に応じて変化するので、前記光量の低下度合いを測定することにより測定対象物質の定量を行うことができる。実際には、S/N比の改善のため、励起光をチョッピングし、その周波数に同期しているプローブ光の光量変化のみをロックインアンプで検出することが一般的に行われている。

20 上記のように熱レンズ検出法では、励起光とプローブ光との通常2種の光源（レーザー等）が必要である。ArレーザーとHe-Neレーザーとを用いて光熱変換検出法（熱レンズ検出法）で検出を行う例として、溝が刻まれたチップの外部からポンプにより送液するキャピラリ分析装置に適用した例もある（ぶんせきNo. 4, 280-284, 1997、M. Harada, et. al., Anal. Chem. Vol. 65, 2938-2940, 1993、川西, 他 日本分析化学会第44年会講演要旨集, p119, 1995）。

25



このような熱レンズ検出法を用いて、検体中の測定対象物質の量を測定することが検討されている。

例えば、K. Sato、T. Kitamori らは、Arレーザー光（波長：488 nm）を励起光、He-Neレーザー光（波長：632.8 nm）を  
5      プロブ光として用いて、色素であるサンセットイエローの測定を行っている（Analytical Sciences Vol.15, 525-529, 1999）。

Kitamoriらが改良した熱レンズ検出法は、マイクロチップが有する数十 $\mu$ m程度の深さ及び幅のキャピラリ中の微量物質を測定するために、顕微鏡を利用して励起光及びプロブ光をキャピラリに集光するように  
10      したものであり、顕微熱レンズとも言えるものである。

このような顕微熱レンズにおいては、キャピラリ中の微小空間に励起光及びプロブ光の焦点を結ばせるので、光源としては色収差のない波長のそろったレーザーが好ましい。

また、Nd:YAGレーザー光（波長：355 nm）等を励起光、He-Neレーザー光（波長：632.8 nm）をプロブ光として用い  
15      て、 $\beta$ カロチンの量を測定した例もある（例えば、S. Luterotti, et. al., J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21(1999), 901-909 やJ. Amador-Hernandez, et. al., Applied Spectroscopy Vol.52, 1465-1471, 1998 など）。

さらに、Arレーザー光（波長：514.5 nm）を励起光、He-Neレーザー光（波長：632.8 nm）をプロブ光として用いて、医薬などとして有用なクレンブテロールを測定した例もある（例えば、Y. Martin Biosca, et. al., J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(1996), 1037-104など）。

25      これらの方法においては、検体中の測定対象物質そのものの吸収を利用し、その物質の吸収に適した波長を持つ励起光源を使用して、熱レン

ズ検出法により測定を行っている。しかしながら、測定対象物質が常に都合のよい吸収波長を有するとは限らない。

5 一般に、ArレーザーやHe-Neレーザーなどのガスレーザーは高価であるので、簡便なPOC分析等には、安価に入手可能な半導体レーザーを光源として使用することが望ましい。現在、安価に入手可能な半導体レーザーは波長が概ね580nm以上であり、より安価には600nm以上、さらに安価には630nm以上である。

したがって、吸収波長が上記の波長以下である測定対象物質については、何らかの方法で測定対象物質から580nm以上の吸収を有する物質（以降は、長波長物質と称する）を生成させ、その長波長物質を測定  
10 することで、測定対象物質の量を間接的に測定するという方法を用いる必要がある。

熱レンズ検出法による測定法については、本出願人も、日本国特許願平成10年第181586号明細書（「混合分析装置及び混合分析方法」）、日本国特許願 平成10年第181587号明細書（「キャピ  
15 ラリ光熱変換分析装置」）、日本国特許願 平成10年第167603号明細書（「分析装置」）、国際出願PCT/JP99/03158号明細書（「光熱変換分光分析装置」）、日本国特許願 2000年第2057号明細書等を出願している。

20 これらの明細書においては、微量の血液試料の成分を分析する方法の例として、血中総コレステロール及びグルタミクオキザロアセティックトランスアミナーゼ（GOT）を測定する方法が記載されている。これらの測定方法においては、測定対象物質を出発物質として、酵素を用いた反応により過酸化水素を発生させることが要点である。

25 このように、過酸化水素を発生させることにより長波長物質を生成させて測定対象物質の量を間接的に測定する方法は、吸光度法でも知られ

ている。

例えば、血中総コレステロールの測定の場合は、コレステロールエステルをコレステロールエステラーゼにより加水分解してコレステロールを得、もともと遊離していたコレステロールとともにコレステロールオキシダーゼにより酸化して、過酸化水素を発生させる。

そして、この過酸化水素によって、3, 5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)アニリンナトリウム（以降は、DAOSと記す）と4-アミノアンチピリン（以降は、4-AAと記す）とを酸化縮合させて、反応生成物として青色色素を生成させる。そして、この青色色素の吸光度（波長：600nm）を測定することにより、血中総コレステロール量を求める。この測定方法については、和光純薬工業株式会社の総コレステロール測定用HAテストワコー、コレステロールE-HAテストワコーに添付の説明書に記載されている。

また、DAOSの代わりにN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン（以降は、EMSEと記す）を用いて、吸光度法（波長：555nm）により測定した例が、臨床検査法提要（金井泉著，金原出版，1998年，p555～556）に記載されている。

さらに、GOT測定の場合は、L-アスパラギン酸ナトリウムと $\alpha$ -ケトグルタル酸とを基質として、検体中のGOTによりオキサロアセテートを生成させ、次いで、オキサロアセテートをオキサロアセテートオキシダーゼによりピルベートに導き、さらにピルベートを酸素とピルベートオキシダーゼとにより酸化して過酸化水素を生成させる。

そして、生成した過酸化水素とパーオキシダーゼとにより、4-AAとN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-

トルイジンナトリウム（以降は、T O O Sと記す）とを酸化縮合させ色素を生成させる。そして、この色素の吸光度（波長：5 5 5 nm）を測定することによりG O Tの量を求めるのである。この測定については、株式会社カイノスの体外診断用医薬品添付文書集1 9 9 8年版の2 7 9  
5 ～2 8 0頁に記載されている。

このように、測定対象物質にその種類に応じたオキシダーゼを作用させて過酸化水素を生成させることができれば、D A O S（あるいは、E M S E，T O O S等の類似色素）と4 - A Aとの酸化縮合物を比較的容易に生成させることができる。そして、長波長のレーザー光を励起光として用いて熱レンズ検出法によりこの酸化縮合物（青色色素等）を測定  
10 することにより、測定対象物質の測定を間接的に行うことができる。

しかしながら、すべての物質から過酸化水素が誘導できるわけではないことは、言うまでもない。

例えば、臨床診断に有用な血液分析においては、ヘモグロビン、アルカリフォスファターゼ等が測定対象物質である。しかし、ヘモグロビン、  
15 アルカリフォスファターゼ等から過酸化水素を発生させる反応は、一般的ではない。したがって、これらの測定対象物質に関しては、上記のような過酸化水素の生成を伴う反応を利用した測定方法は、行われていなかった。

したがって、ヘモグロビン等のような過酸化水素に誘導し難い物質については、ヘモグロビン等から長波長物質を生成するような試薬や反応を見出すことが必要である。  
20

特に、キャピラリ中で測定を行う場合は、沈殿の生成が測定に多大な悪影響を及ぼすので、沈殿や微結晶を生じることがない試薬や反応を見出す必要がある。  
25

次に、これらの物質の従来の測定法を詳述する。まず、ヘモグロビン

について説明する。

血液試料中のヘモグロビンを測定することは、貧血症や多血症等の臨床診断において重要である。

5 従来の吸光度法を用いたヘモグロビン測定方法はいずれも、デスクトップからベンチトップ程度の比較的大型の自動検査機に適合するよう改良されてきたものである。そのため、測定用のキュベット（セル）は数百 $\mu$ lから1ml程度の大きなものであり、測定に必要な光路長を2～10mm程度に取ることが可能なため、吸光度法で検出することが可能であった。

10 従来のヘモグロビンの測定方法としては、シアンメトヘモグロビン法、SLS法、アザイドメトヘモグロビン法、アルカリヘマチン法等があるが、いずれも吸光度法により測定する方法である。

15 全血を溶血させヘモグロビンを吸光度で測定する方法としては、シアンメトヘモグロビン法が多く用いられており、国際基準法としても定められている。ここで、シアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビンの測定方法を簡単に説明する。

まず、血液試料にノニオン性界面活性剤等を含む赤血球溶解剤を添加し、赤血球中に含まれるヘモグロビンを溶出する。次に、溶出したヘモグロビンをフェリシアン化カリウム等の酸化剤により酸化し、メトヘモグロビンに転化させる。そして、シアンイオンを添加することによって、メトヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンとし、安定なヘモグロビン測定試料を調製する。

25 このシアンメトヘモグロビンは540nmに吸収を持つため、540nmの吸光度を測定することでヘモグロビンを定量することができる。しかし、シアンメトヘモグロビンは540nmに吸収を持つものの、600nm以上には吸収を持たない。したがって、現在安価に入手可能な

半導体レーザーが600nm以上であるから、安価な半導体レーザーを励起光又は吸収光源としたヘモグロビンの測定方法にシアンメトヘモグロビン法は適用することはできない。

5       その上、この方法では、測定試薬が毒物であるシアン化カリウムを含有しているので、測定試薬の取り扱いに危険が伴う。さらに、測定後の廃液は次亜塩素酸ナトリウム等を用いてシアニドを分解した後に廃棄する必要がある、廃棄処理が煩雑である。

10       このような毒物の問題を解決する方法として、中性緩衝液中にアニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム又はラウリル硫酸ナトリウム（以降はSLSと記す）及びトリトンX-100（商品名）を含有するヘモグロビン測定試薬が、クリニカル・バイオケミストリー15巻83（1982）に開示されている。

15       この方法では、赤血球をSLS及びトリトンX-100の働きで溶解し、溶出したヘモグロビンを、SLSと酸素との働きでメトヘモグロビンとすると同時にSLSヘモグロビンに転化する。このSLSヘモグロビンは540nmに吸収を持つため、540nmにおける吸光度を測定することで、ヘモグロビンを定量することができる。

20       この方法では、測定試薬がシアニドを含有しないので、煩雑な廃液処理は不要である。しかし、SLSヘモグロビンは、シアンメトヘモグロビンと同様に540nmの吸収は持つものの、600nm以上の吸収は持たない。そのため、600nm以上の波長を持つ安価な半導体レーザーを光源とする光学的測定方法には適用できない。

25       また、ヘモグロビン自体のパーオキシダーゼ活性を利用した定量法も知られている。日本国特許公開公報 昭和59年第222766号（テルモ株式会社）には、ヘモグロビン自体のパーオキシダーゼ活性を利用して、試薬として加えた過酸化水素によりテトラメチルベンジジンを経

化して、その生成物の吸光度（波長：660 nm）を酢酸中で測定することにより、ヘモグロビンを測定する方法が記載されている。

さらに、日本国特許公開公報 平成2年第122267号（ミドリ十字社）には、ヘモグロビン自体のパーオキシダーゼ活性を利用して、クエン酸溶液中のテトラメチルベンジジンを過酸化ストロンチウムにより酸化して、その生成物の吸光度（波長：650 nm）を測定することにより、ヘモグロビンを測定する方法が記載されている。

これらの方法はいずれも、赤血球の溶血工程は含まれていないから、血漿、血清、尿などに含まれる可溶化された微量のヘモグロビン（全血中のヘモグロビン量（十数 g/dl）に比べて100分の1程度の低濃度）を測定したものであって、全ヘモグロビンを測定したものではない。さらに、これらの方法は、血漿などに存在するヘモグロビンパーオキシダーゼ活性阻害因子により、検量線の作成が容易ではない。また、吸光度測定であるので、マイクロチップ等を用いた微量の検体の測定には適さない。

一方、日本国特許公開公報 平成9年第278786号（ポーラ化成社）には、通常では波長540 nmにおける吸光度を測定するシアンメトヘモグロビン法に改良を加えて、ペクチンやオリゴガラクチュロン酸を添加することにより、吸光度を増強させ感度を向上させた測定法が記載されている。この方法においては、吸光度が増強するとともに、吸収波長が長波長側にシフトし、680～685 nmでの測定が可能となる。しかし、吸光度が増強されたとは言え、この方法には吸光度測定の感度の限界（検体量の限界）があり、また、シアンを用いるという問題点がある。

さらに、熱レンズ検出法を用いて、白血病白血球中の異常ヘモグロビン産生を検出した例が知られている（Wu, Kitamori, Saw

ada, Ana. Chem. 63, 217-219, 1991、北森、  
澤田、ぶんせき 3, 178-187, 1994)。この方法は、顕微  
鏡検鏡下でスライドガラス上で白血球細胞を一つ分離し、細胞を壊すこ  
となく、そのままヘモグロビンの420nmの吸収をXeランプで励起  
5 する。そして、He-Neレーザーをプローブ光として、白血球外の上  
部空間に形成される熱レンズを検出することにより、白血病で異常にな  
った白血球が産生するヘモグロビンを測定している。

しかし、血液中のヘモグロビン濃度を求めるためには、所定体積の血  
液を溶血させ、その中に存在する全赤血球由来のヘモグロビンを測定す  
10 ることが必要であるので、この方法では、貧血などの診断に必要な血液  
中の赤血球ヘモグロビン量を測定することはできない。その上、励起光  
の波長が420nmであるので、安価な半導体レーザーを用いることは  
難しい。

また、ゲル電気泳動で分離したヘモグロビンを、シングルビーム法の  
15 熱レンズ検出法により測定した例も知られている(MA Thompson, et. al.,  
Applied Spectroscopy, Vol.46, 945-947, 1992)。しかし、この  
例でも、励起光の光源には高価なArレーザー(波長: 514.5nm)  
m) が使用されている。さらに、測定には、18cm×16cm×75  
0μmという大きなスラブゲル、つまり固体相を用いていて、マイクロ  
20 チップ中で液体試料を測定するというものではない。

このように、全血中のヘモグロビン濃度を、極微量の血液試料から、  
600nm以上の波長を持つレーザーを用いて測定する方法は知られて  
いない。

次に、血液試料中のフォスファターゼの測定方法について説明する。  
25 フォスファターゼの測定方法としては、p-ニトロフェニル磷酸エステ  
ルを基質として用いる方法が基準法として広く行われている(臨床検査



法提要，金井泉著，金原出版，1998年，p613～615）。この方法は、フォスファターゼによりp-ニトロフェニル磷酸を加水分解し、生成したp-ニトロフェノールを波長405nmにおける吸光度により測定するものである。

- 5       p-ニトロフェノールは波長550nm以上では実質的に吸収がないので、安価なレーザーを用いた熱レンズ検出法にこの反応系を採用することはできない。このことは、デンカ生研株式会社のALP-S試薬の添付書などにも記載されている。

- 10       また、生成したp-ニトロフェノールと4-AAとを、メタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化縮合して赤色キノン色素を生成させ、波長500nmにおける吸光度で比色定量する方法も知られている（株式会社カイノスの「体外診断用医薬品添付文書集1998年版」の277～278頁に記載）。

- 15       さらに、日本国特許公開公報 平成7年第33789号（富士フィルム株式会社）に記載のように、より長波長側に吸収を有するアルカリフォスファターゼ（以降はALPと記す）の基質としてアゾ色素を使用する方法も検討されてきた。しかし、この方法は吸光度法による測定のためのものであって、光熱変換検出法による測定のためのものではない。

- 20       一方、血液由来の検体を吸光度で測定する場合の一般的な問題として、乳びがあげられる。乳び（chyle）とは、消化過程で腸の乳び管から取り込まれる混濁した白色又は薄黄色の液体で、リンパ線によって胸管を経て循環器中へ運ばれる。

- 25       乳びは、リンパ液中のカイロミクロンにより牛乳状の外観を呈している（ステッドマン、医学大辞典、メジカルビュー社）。すなわち、血液中において、コレステロールや中性脂肪がミセルやリポゾームなどを形成し、白濁状態を呈している。

乳びが生じている血液検体では「濁り」が発生しているため、吸光度測定の場合は測定結果に悪影響が生じる。すなわち、吸光度測定では、濁りによる吸収と測定対象物質や反応生成物の吸収との区別がつきにくい。そのため、通常は、測定対象物質や反応生成物の吸収がない700  
5 ~800nmという長波長において対照吸光度を測定し、次に、測定対象物質や反応生成物の吸収波長における吸光度を測定して、両吸光度の差を測定値としている（前述の臨床検査法提要や株式会社カイノスの「体外診断用医薬品添付文書集1998年版」等に記載されている）。

このような操作により、吸光度計のセル（キュベット）の汚れなどによる影響も補正できるが、1サンプルにつき異なる2つの波長において測定を行う必要がある。

本発明は、上記のような従来技術の問題点を解決するためになされたものであり、その目的は、POC分析等に適用するのに好適な測定方法であって、安価な長波長のレーザーを励起光の光源とする熱レンズ検出  
15 法により、キャピラリ中で微量の生体成分由来試料中の物質を、安価で簡便且つ短時間で測定できる方法を提供することにある。

特に、ヘモグロビン、フォスファターゼ等のような過酸化水素に誘導し難い物質を測定できる方法を提供することを目的としている。

また、本発明は、乳びを呈する血液試料でも、1回の測定で血液試料  
20 中の物質を定量できる測定方法を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、上記の測定方法において好適に使用され、微量の生体成分由来試料中の物質を安定して測定することができる測定試薬を提供することを目的とする。

## 25 発明の開示

前記目的を達成するため、本発明は次のような構成からなる。すなわ

ち、本発明の物質の測定方法は、生体成分由来試料中の物質を検出又はその濃度の測定を行う方法であって、試料調製工程と光熱変換検出工程とを備えていて、前記試料調製工程は、前記生体成分由来試料と測定試薬とを混合し反応させ、過酸化水素を誘導することなく、前記物質とは

5 吸収波長が異なる反応生成物を前記物質の量に対応する量だけ生成させて、測定試料を調製する工程であり、前記光熱変換検出工程は、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する工程であるとともに、前記反応生成物は水溶性を有し、且つ、前記励起光の波長領域における前記反応生成物の吸光度は、

10 前記温度変化を生じさせるに足るものであることを特徴とする。

前記物理量変化を屈折率変化とすれば、前記光熱変換検出工程は、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することができる。

15 また、前記励起光の波長は、600 nm以上であることが好ましい。

さらに、前記生体成分由来試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことができる。

前記キャピラリは、板面に溝を備えた一对の平板状部材を、前記溝を

20 備えた板面を内側にして貼り合わせるにより形成されるものでもよい。なお、前記溝は、前記一对の平板状部材のうち少なくとも一方に備えられていればよい。

また、前記生体成分由来試料を血液試料、前記物質をヘモグロビンとし、前記試料調製工程を、前記血液試料と前記測定試薬とを混合し溶血

25 させて前記測定試料を調製する工程とすれば、血液試料中のヘモグロビンを測定することができる。

このとき、前記励起光の波長を610 nmから650 nmの範囲とし、かつ前記プローブ光の波長を前記励起光よりも長波長とすることが好ましい。

- 5 前記励起光の波長を620 nmから640 nmの範囲とし、かつ前記プローブ光の波長を前記励起光よりも長波長とすることもできる。

また、前記測定試薬は、赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、pHを5から7の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むものとすることができる。

- 10 なお、前記測定試薬はシアニドを含有しないことが好ましい。

さらに、前記血液試料と前記測定試薬との混合比は、1 : 1から1 : 250の範囲であることが好ましい。

- さらに、前記物質をフォスファターゼとし、かつ、前記測定試薬を前記フォスファターゼに対する基質を含有するものとし、前記試料調製工程を、前記生体成分由来試料と前記測定試薬とを混合し、前記生体成分由来試料中のフォスファターゼと前記測定試薬中の前記基質とを反応させて測定試料を調製する工程とすれば、生体成分由来試料中のフォスファターゼを測定することができる。
- 15

前記基質はリン酸エステル結合を有するものとすることができる。

- 20 なお、前記基質は、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェート及びその塩のいずれかであることが好ましい。

さらに、前記フォスファターゼはアルカリフォスファターゼであってもよい。

- さらに、前記測定試料中の前記基質の濃度は、1 ~ 15 mMの範囲であることが好ましい。
- 25

さらに、前記生体成分由来試料と前記測定試薬とを混合してから、前

記物理量変化を測定するまでの時間は、3～15分とすることが好ましい。

さらに、本発明の物質の測定方法は、乳びを呈する血液試料中の物質を検出又はその濃度の測定を行う方法であって、前記血液試料と測定試薬とを混合して測定試料を調製する試料調製工程と、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換検出工程と、を備えることを特徴とする。

前記物理量変化を屈折率変化とすれば、前記光熱変換検出工程は、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することができる。

また、前記血液試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことができる。

前記キャピラリは、板面に溝を備えた一对の平板状部材を、前記溝を備えた板面を内側にして貼り合わせるにより形成されるものでもよい。なお、前記溝は、前記一对の平板状部材のうち少なくとも一方に備えられていればよい。

さらに、本発明の測定試薬は、前記物質がヘモグロビンの場合の測定方法において用いる測定試薬であって、赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、pHを5から7の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むことを特徴とする。

さらに、本発明の測定試薬は、前記物質がフォスファターゼの場合の測定方法において用いる測定試薬であって、リン酸エステル結合を有する基質を備えることを特徴とする。

なお、前記基質は、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェート及びその塩のいずれかであることが好ましい。

以下に、本発明を詳細に説明する。

5 血液、尿等の生体由来の検体や環境分析等の検体に含まれる成分を測定する方法としては、検体の量が微量である場合には、キャピラリを有するマイクロチップと熱レンズ検出法とを組み合わせる方法が有用である。背景技術の項で述べたように、数十から数百 $\mu\text{m}$ 程度の深さ及び幅を有するキャピラリ中で、熱レンズ検出法により物質を測定するためには、励起光とプローブ光とがキャピラリに集光されることが好ましい。

10 そのため、前記両光の光源としては、色収差などの問題を有する白色光光源ではなく、波長のそろったレーザーや発光ダイオードなどが好ましい。ただし、短波長のレーザーや発光ダイオードは非常に高価であり、また、熱レンズを形成するには励起光の光源がある程度の出力を有していることが必要である。したがって、現在比較的安価であり、ある程度  
15 の出力を有する長波長の半導体レーザが好ましい。なお、数mW程度以上の出力を持つものならば、発光ダイオードも安価な光源として本発明において使用することができる。

励起光及びプローブ光の波長は、580nmよりも長波長とする。特に、600nm以上、さらには630nm以上の波長の半導体レーザー  
20 や発光ダイオードが安価であり好ましい。

このような背景のもとに、キャピラリ内の物質を熱レンズ検出法により測定するための条件を以下に記す。

a) 測定対象物質そのもの、又は、それから酵素的・化学的に誘導される物質（以降、反応生成物と記す）が、励起光の波長領域において熱  
25 レンズを形成するために十分な吸光度を有すること。

b) 測定対象物質及び反応生成物が、キャピラリ中で沈殿を生じない

こと。

さらに、必須条件ではないが、プローブ光の波長は励起光の波長よりも長波長であることが望ましい。

上記の条件について、以下に詳述する。

5       血液、尿等の生体由来の検体中に存在する物質の内、580 nm以上の波長の吸収、特に630 nm以上の波長の吸収を、それ自身が有する物質は極めて少ない。かなり長波長の吸収を有するヘモグロビンですら、540～577 nmの吸収が大きく、生体中にわずかに存在するメトヘモグロビンに由来する弱い吸収が、630 nmにあるだけである。

10       ビリルビンなども630 nm以上の波長の吸収はかなり弱いので、定量的な測定が困難である。

      また、血中に存在する酵素などは、通常は紫外領域にしか吸収を持たない白色蛋白であるものが多く、さらに、各酵素や夾雑蛋白の吸収が重なるので、定量的な測定が困難である。そのため、血中の酵素を定量する際には、その酵素によって長波長領域に吸収を有する物質（反応生成物）に変化する特異的な基質を用いて反応生成物を生成させ、この反応生成物を定量することにより酵素の量（正確には酵素活性）を定量することが必要となる。なお、以降はこのような反応を長波長化反応と称する。

20       また、コレステロールなどのような酵素以外の血中物質を定量する際には、その物質を選択的に基質（酵素と反応する物質）とする酵素の作用や化学反応によって、長波長領域に吸収を有する反応生成物に前記血中物質を誘導する必要がある。

      したがって、安価な励起光の光源を使用する測定を可能とするためには、上記反応生成物の吸収波長が580 nm以上、より安価には600 nm以上、さらに安価には630 nm以上になるように、測定対象物質

から前記反応生成物に誘導する反応や測定試薬を見出す必要がある。反応生成物が十分な量の励起光を吸収し、且つ、光源が安価であれば、吸収波長の上限は特に限定されないが、通常800nm以下がよく用いられる。

- 5      臨床化学分析における発色試薬の開発の流れの一つに、血液中の干渉物質の分析に対する影響を低下させるということがある。このための手段として、生体成分に固有の吸収波長を避けるような長波長の吸収を有する発色試薬が検討された。現在でも、溶血検体中のヘモグロビンや黄疸患者の検体中のビリルビンの吸収波長よりも長波長側に入maxを持つ
- 10      発色試薬の開発が続けられている（青山典仁，臨床検査，41，9，1014（1997））。血液中のヘモグロビン及びビリルビンの影響を低下させるためには、少なくとも600nm以上の波長領域で測定する必要がある（干渉チェック・Aプラス添付参照データ（国際試薬株式会社））。一方、ヘモグロビン量の測定に関しては、酸性雰囲気下でメト
- 15      ヘモグロビンが630nmの吸収を示すことから、ヘモグロビンと他の生化学項目を共通の光源で測定する場合には、光源の波長として600～650nmの領域が重要である。

- 20      マイクロチップのキャピラリー内で混合，反応させ、さらに測定を行うことから、上記の長波長化反応において沈殿が生じることは好ましくない。マイクロチップのキャピラリー内やマイクロチップのキャピラリー以外の部分において、液体（測定試料）の流動の障害となるような大きさの沈殿が生じることは避けなければならない。液体の流動が少しでも乱れると、定量的な混合や反応時間の制御に対して悪影響が出る恐れがあるからである。

- 25      また、マイクロチップの検出部に沈着した沈殿は、励起光やプローブ光の散乱を生じさせるので、測定の定量性を大きく低下させる可能性が



ある。さらに、本発明者らは、吸光度法ではほとんど問題にならないような長波長化反応の反応生成物の小さな析出物（微沈殿、微結晶）が、熱レンズ検出法では大きな問題となることを見出した。

一例として、ALPの測定について述べる。ALPの定量は、ALPの活性を測定することによって行うのが一般的である。つまり、基質中の5 磷酸エステル部分がALPによって加水分解されて、基質由来の色素が発色するので、その色素を測定するのである。

通常はp-ニトロフェノール燐酸エステルを基質として、加水分解により生成したp-ニトロフェノールの405 nm付近の吸収を吸光度計で測定する。しかしながら、安価な励起光の光源を使用する場合には、前述のように、より長波長に吸収を有する反応生成物を生じさせる必要がある。630 nm付近に吸収を有する反応生成物を生じるALPの基質として市販されている研究試薬としては、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェートがあげられる。

この基質が加水分解された 5-ブromo-4-クロロ-3-ヒドロキシ  
インドールは、酸素で酸化され二量化することにより、600 nm 以上  
に吸収を有する青色の色素となる。この二量体は水への溶解度が高くない  
ため、ALP 濃度、基質濃度、及び反応時間等の条件、つまり、これ  
らの組合せの結果による長波長化反応の反応生成物の濃度には、熱レン  
ズ検出法に適した範囲が存在することとなる。そして、その範囲よりも  
反応生成物の濃度が高くなると、後述する比較例 1 のように微結晶が生  
じて、熱レンズ検出法による測定が困難となってしまう。

このような微結晶は、通常取り扱いにおいては溶液に浮遊、分散しており、一晩放置しても沈殿するものではない。この微結晶は、吸光度測定ではほとんど悪影響を及ぼさないが、熱レンズ検出法では測定不能となるほどの悪影響を及ぼす場合がある。したがって、強い遠心操作を

行う等により微結晶を沈殿させる必要がある。

ただし、励起光を吸収する微結晶（微沈殿）が浮遊、分散していると、熱レンズ検出法による出力（熱レンズ信号）が不安定になる理論的な理由については明確ではない。なお、同じ微粒子でも、励起光を吸収しないポリスチレンなどのラテックスビーズ（直径500nm程度）が存在しても、熱レンズ検出法による出力は測定可能である。

このように励起光を吸収しない濁りや微粒子が存在しても熱レンズ検出法による測定が可能であることは、乳びを呈する血液試料中の物質を測定する際には、特に有利に働く。

すなわち、背景技術の項で述べたように、乳びは広い波長範囲において吸光度測定に悪影響を与える。そのため、測定対象物質の吸収波長における測定と、乳びだけの影響をみる濁度測定のためのより長波長での測定との2つの波長における測定が必須となる。

それに対して、熱レンズ検出法の場合は、後述するように適度な希釈を行えば、乳びは測定に悪影響を与える恐れがほとんどない。これは、励起光を100～3000Hz程度の周波数でチョッピング（on/off）して、それに同期するプローブ光の光量変化のみを取り出して、熱レンズ検出法による出力を検出しているためである。励起光を吸収しない濁りは、吸光度の絶対値を経時変化なしに大きく見せるが、チョッピングされた励起光と同期した熱変化を測定試料中に生じさせることはない。

ヘモグロビンを熱レンズ検出法により測定するためには、ヘモグロビンから過酸化水素を誘導し、この過酸化水素により長波長物質を生成させる方法（測定試薬、反応）を見出す必要がある。つまり、ヘモグロビンに特異的な酸化酵素（過酸化水素を発生する）を見出したり、背景技術の項に記載したヘモグロビン自身のパーオキシダーゼ活性を全血中の

ヘモグロビンの測定に応用できるように、反応系に改良を加えたりする必要がある。そうすれば、過酸化水素及びパーオキシダーゼから、例えば、DAOSと4-AAとの酸化縮合生成物（長波長物質）を生成させることができる。

- 5        しかしながら、上記のいずれにおいても、酸化酵素が容易に入手できない、全血中でのヘモグロビンのパーオキシダーゼ活性は定量的に活用しにくい、などの課題がある。よって、長波長物質としては、ヘモグロビン自身の長波長物質、すなわち、メトヘモグロビンを利用することが、安価な励起光の光源を使用する場合には適している。

- 10        メトヘモグロビンは水溶性が高いため、測定時に沈殿が生成するなどの問題はない。ただし、メトヘモグロビンは不安定であるため、後述するような工夫を加えることにより、安定した定量的な測定を可能とした。

以下、ヘモグロビン及びALPを測定する方法について、さらに詳述する。

- 15        （ヘモグロビンの吸収波長について）

血液中のほとんどのヘモグロビンは、2価の鉄に酸素が結合したオキシヘモグロビン、及び酸素を離したデオキシヘモグロビンの状態で存在し、ごく一部が酸素を結合することができない3価の鉄に酸化されたメトヘモグロビンになっている。

- 20        オキシヘモグロビンの吸収は540nmと577nmとにあり、デオキシヘモグロビンは555nmに吸収がある。また、メトヘモグロビンはpHによって吸収が変化し、酸性では630nm、強塩基性ではより短波長領域に吸収があり、赤味が増す。

- 25        このように血液中のヘモグロビンは、オキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビンだけでも3つの吸収を持つため、このままでは全ヘモグロビンの定量は難しい。そのため、従来は、一旦血液試料を溶血させ、そ

れにフェリシアン化カリウムのような酸化剤を添加することで、全てのヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化していた。生成したメトヘモグロビンは不安定なので、青酸カリ（KCN）等を添加してCNイオンをヘム鉄に配位させ、540 nmに吸収を持つ安定なシアンメトヘモグロビンに誘導してから、540 nmの吸光度を測定していた。

しかしながら、先述したように、マイクロチップ中でヘモグロビンの定量を行う場合は、吸光度法による測定は困難であり、熱レンズ検出法により検出することが好ましい。POC分析等での使用を考えると、高価なガスレーザーではなく、安価な半導体レーザーが使用できる波長でヘモグロビンを励起し、熱レンズの変化を検出することが好ましい。現在における安価な半導体レーザーや発光ダイオードの波長は600 nm以上であるので、それ以上の吸収を有するように血液中の全てのヘモグロビンを誘導する必要がある。

そこで、励起光が照射されている状態下のメトヘモグロビンの吸収の安定性を検討した。すなわち、熱レンズ検出法においてマイクロチップのキャピラリーに照射する励起光と同一波長で、その測定試料（反応後の液）を光路長を1 cmと長くとしたキュベット中に入れて、吸光度の測定を行った。

もし吸光度が不安定であれば、原理的に熱レンズ検出法による出力も不安定となるため、吸光度が安定且つ高精度で測定できることが、熱レンズ検出法に対しての必要条件となる。

後述する実験例1に示すように、青酸カリを添加しないで、630 nmの吸収を持つメトヘモグロビンにヘモグロビンを酸化した。そして、これに633 nmのレーザー光を照射して、その吸光度変化が容量依存性があるかを検討した。その結果、630 nmの波長でもヘモグロビンを定量することが可能であった。

(血液試料と測定試薬の混合比について)

しかしながら、本発明者らの検討により、血液試料とヘモグロビン測定試薬とを混合して測定試料とする際に、通常の混合比(1:250以上)では、熱レンズ検出法による出力が時間に対してやや不安定で、経時的に少しずつ減少していくことがわかった。例えば、1:250では、  
5 630nmの吸光度が20分で8.5%減少するにとどまるが、1:415では16%の減少、1:1250では31%もの減少となり、臨床診断には適用しにくい精度となる。

比較的低い精度のヘモグロビン測定であれば、これでも測定は可能だが、精度の高い測定を行うには、改善が必要であった。本発明者らは、  
10 種々検討した結果、血液試料と後述する組成を持つ測定試薬との混合比を、1:1から1:250以下にすれば、この熱レンズ検出法による出力の経時変化(減少)が避けられることを見出した。

さらに、マイクロチップ中でヘモグロビン測定を行う場合は、血液試料と測定試薬との混合比は1:250を越える場合、例えば1:500  
15 等の場合はマイクロチップ内で混合することは難しい。なぜなら、まず、血液試料が微量でも、大量の測定試薬が必要なため、マイクロチップ内の測定試薬リザーバが大きくなりすぎる欠点がある。

また、1:500という混合は、マイクロチップの細いキャピラリ中で均一に混合することは困難である。したがって、均一な混合を実現するための特殊な流路構造(邪魔板、攪拌など)や、著しく長い流路等が必要となる。その点からも、混合比を小さくすることは好ましい。  
20

本発明における血液試料と測定試薬との混合比は、1:1から1:250が好ましく、より好ましくは1:1から1:50、さらに好ましくは1:1から1:10である。この混合比が1:1より小さいと、例えば1:0.1などになると、溶血に十分な測定試薬、浸透圧を与えるこ  
25

とが難しくなる上、マイクロチップ内の送液において血液の粘度の影響を無視できなくなる。

(測定試薬の組成について)

5 本発明のヘモグロビンの測定方法において使用される測定試薬中に含まれる中性界面活性剤は、全赤血球を溶解する十分な界面活性能があれば、特に限定されない。中性界面活性剤の種類としては、具体的には、6-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（例えば、シグマ社のトリトンX-100）等のポリオキシエチレンエーテル類や、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（例えば、ICI社やシグマ社のツイーン20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエイト（例  
10 えば、ICI社、シグマ社等のツイーン80）等のポリオキシエチレンソルビタン類（ツイーン）などが用いられる。

また、SLS等のアニオン性界面活性剤や、セチルトリブチルアンモニウムブロマイド（CTAB）等のカチオン性界面活性剤なども、用い  
15 ることができる場合もある。溶血時にpH変化を来さない程度であれば、これらのイオン性界面活性剤も使用可能である。界面活性剤の詳細なリストは、成書に記載されている。例えば、Gower社のHandbook of Surfactant 第2版、第1巻及び第2巻（1997年）などである。

20 本発明における測定試薬は、血液試料中の赤血球をすべて溶血させる量を添加すればよい。本発明における測定試薬は、1:1~1:250の比で血液試料に添加される。その結果、得られる混合物中の界面活性剤の濃度は、0.5から1.1重量%であることが好ましく、より好ましくは0.7から0.9重量%、さらに好ましくは0.8重量%である。

25 また、測定試薬中に使用しうる酸化剤は、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化するものであれば特に限定されないが、好ましくはフェリ

シアン化カリウムである。本測定試薬は全ヘモグロビンを酸化するのに十分な量を、血液試料に添加する。

後述の実験例 1 に酸化剤濃度の検討結果を示したように、熱レンズ検出法の必要条件であるメトヘモグロビンの酸化は、血液試料  $1 \mu\text{l}$  に対し酸化剤が  $50 \sim 10000 \text{ nmol}$  (絶対量) であることが好ましく、  
5 より好ましくは、血液試料  $1 \mu\text{l}$  に対し酸化剤が  $100 \sim 4000 \text{ nmol}$  (絶対量) である。

また、本測定試薬の pH 値は、メトヘモグロビンの吸収を  $630 \text{ nm}$  に保つため、弱酸性～弱アルカリ性の範囲であることが好ましい。実験  
10 例 1 と同様に、熱レンズ検出法の必要条件である、励起光が照射されている状態下のメトヘモグロビンの吸収の安定性を検討した結果 (後述する実験例 2 を参照)、その pH は  $4 \sim 8$  であることが好ましく、より好ましくは pH  $5.0$  から  $7.0$  であり、さらに好ましくは pH  $5.7$  から  $6.3$  である。上記のような pH 値を維持するため、PBS 等のリン  
15 酸バッファーや種々のグッドバッファーなど、通常の緩衝剤が使用される。

本発明の測定方法における反応系及び反応生成物の性状の必要条件は、

c) 過酸化水素を経由しない反応系であること  
d) 反応生成物が、安価な半導体レーザーの波長に吸収を有する色素  
20 系の物質であること

e) 反応生成物の性状は、レーザーの光径に対して十分な均一性を有する溶液状であること  
である。

現在市販されている半導体レーザーの中で安価な物は、おおよそ  $635 \sim 645 \text{ nm}$  以上の波長の物である。したがって、本発明の測定方法  
25 における反応系としては、上記波長に吸収を有する色素系の物質を生成

する反応が好ましい。

(アルカリフォスファターゼ活性の定量測定について)

5      フォスファターゼ活性を測定する方法としては、フェニル燐酸の分解物であるフェノールと4-A Aとを酸化縮合させた赤色キノン色素 ( $\lambda_{\max}$  : 500 nm) の吸収スペクトルを600 nm以上の波長領域で測定する方法がある。また、glycerophosphateを直接基質に用い、生成するglycerolをglycerol dehydrogenaseと酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下、NAD<sup>+</sup>と記す)とを用い、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以降はNADHと記す)とdihydroxycetone  
10      one とに還元する方法もある(A.Bianchi,etal.,J.Biochem.Biophys.Methods,28,35,1994)。

また、glycerophosphateを基質とする反応系としては、NADH及びテトラゾリウム塩、具体的には株式会社同仁化学研究所のWSTシリーズを基質として用い、フェナジンメタサルフェート(以降はPMSと記す)若しくはジアホラーゼ活性により還元し発色させる反応系を加えて、  
15      600 nm以上の波長で測定する方法があげられる。

しかし、 $\lambda_{\max}$  が500 nmの赤色キノン色素を600 nm以上の波長で測定する方法では、フォスファターゼ活性の測定において分解能が小さくなってしまう。また、glycerophosphateを基質とする反応系は有効  
20      であると考えられるが、多段階反応であるために基質の反応系の組み合わせ等の最適化が必要である。したがって、本発明の測定方法における反応系に用いるには、さらに検討期間が必要となる。

フォスファターゼ活性測定用の基質で600 nm以上の発色を示す物としては、例えば、日本国特許公開公報 平成7年第33789号に開  
25      示されているものがある。このものは、644 nmに吸収を有する水溶性のフォスファターゼ基質で、ALP測定用の基質として本発明の測定



方法において用いることができるが、容易に入手できる物ではない。市  
販品として入手可能な物としては、5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl phosph  
hate（以降は、BCIPと記す）が分解されて615nmに、また、3-  
Indoxyl phosphateが680nmに発色することが知られている（SUBSTR  
5 TE and Reagent, BIOSYNTH 社カタログ）。

本発明の測定方法の有効性を示す一例として、ALP測定用の基質と  
してBCIPを用いた例を示す。5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl（以降は  
BCIと記す）は、ALP活性を用いた遺伝子等の発現確認、若しくは  
組織染色での検出に用いられることが広く知られている（J.P.Horwitz,  
10 eta l., J.Med.Chem., 9, 447, 1966）。また、5-ブロモ-4-クロロ-3-  
-ヒドロキシインドールの二量体（以降はBCI2と記す）は、水溶性  
が悪く可溶化するのが難しいことも一般的に知られている（J.J.Leary,  
etal., Proc.Natl.Acad.Sci, USA. 80, 4045, 1983）。

よって、ALP活性の定量においてBCIを液状で測定することが困  
15 難であることは自明である。しかし、本発明者は鋭意検討の結果、測定  
試料中のBCIPの濃度を最適なものとすることによって、臨床化学で  
用いられるALP活性の測定に本発明の測定方法が有効であることを見  
出した。

具体的には、直径が約0.1～1μm以下の範囲のBCI2の色素粒  
20 子の生成を抑えるようなBCIPの濃度及び反応時間を規定した。

さらに具体的には、緩衝液をJSCC常用基準法にしたがって作製し  
た。すなわち、1.01M 2-Ethylaminoethanol-HCl（アルドリ  
ッチ社）／0.505mM MgCl<sub>2</sub>（pH9.87）の緩衝液を作  
製した（以降は緩衝液1と記す）。血液試料と反応させる直前に、基質  
25 としてBCIP（和光純薬工業株式会社）を最終の濃度で1～15mM  
となるように緩衝液1に溶解し、ALP測定試薬（測定試薬）を調整し

た。

なお、最終の濃度とは、血液試料と測定試薬とを混合し測定試料としたときの濃度のことである。

そして、反応時間を3分～15分、さらに望ましくは3～6分とした。

5 (BCIPの溶解度について)

基質であるBCIPの純水への溶解度は、ナトリウム塩の場合は20 mg/ml、すなわち54 mMである（シグマ総合カタログ，SIGMA社）。緩衝液1に対するBCIPの溶解度は、約70 mMであった。BCIPの最適濃度を求める目的で、緩衝液1に最終の濃度で70 mM  
10 のBCIPを溶解したALP測定試薬を調製し、これを緩衝液1で段階的に希釈して、BCIPの最終の濃度が70 mM，35 mM，15 mM，10 mM，6.25 mM，5 mM，2.5 mM，1.25 mMのALP測定試薬をそれぞれ調製した。

ALP検体として、調製法を一部改変したサイトロールA（日水製薬  
15 株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）2500  $\mu$ lで溶解し、ALP活性が計算値で800 IU/lになるように調製し、ストック溶液とした。次に、ストック溶液を精製水で希釈して、計算値で400 IU/l及び50 IU/lのALP活性を含む溶液を調製した。

20 (ALP活性の吸光度計による測定について)

ALP測定試薬1000  $\mu$ lと前記検体25  $\mu$ lとを試験管の中で十分混和し、37℃で正確に2分30秒間保温する。その後、反応液全量を光路長1 cmの石英セルに入れ、37℃に空気恒温されている吸光度計により、反応開始から12分30秒まで635 nmにおける吸収度を  
25 測定した。

その結果、全てのBCIP濃度のALP測定試薬において、濃度依存

性を有する検量線が得られ、測定が可能なことが判った（第 12 図参照）。

（ALP 活性の熱レンズ検出法による測定について）

5 ALP 測定試薬 1000  $\mu$ l と前記検体 25  $\mu$ l とを試験管の中で十分混和し、37°C で正確に 2 分 30 秒間保温する。その後、反応液全量を光路長 50  $\mu$ m の石英セルに入れ、37°C に空気恒温されているステージに載置し、反応開始から 5 分まで熱レンズ検出法により測定を行った。

10 その結果、70 mM、35 mM 以外の BCI P 濃度の ALP 測定試薬において、濃度依存性を有する検量線が得られ、測定が可能なことが判った（第 10、11 図参照）。

15 このことから、吸光度計では全ての BCI P 濃度で測定可能だが、熱レンズ検出法では測定が困難な BCI P 濃度があることが判った。この理由を、有色の微粒子（色素粒子）が存在することが原因であると仮定し、各 BCI P 濃度の ALP 測定試薬について反応生成物の粒度分布を測定した。

（レーザー回折／散乱式粒度分布計による BCI 2 粒子径の測定について）

20 BCI P 濃度が 70 mM 及び 6.25 mM の ALP 測定試薬 25 ml を、予め 37°C に予備加温した。そこに ALP 活性を計算値で 800 IU/l に調製した標準血清（血液試料）を、以下のように混合したもの（試料 1～4）をそれぞれ用意した。

まず、試料 1 は、BCI P 濃度が 70 mM の ALP 測定試薬に、前記標準血清 2500  $\mu$ l を混合し、37°C で 3 日間反応したものである。

25 次に、試料 2 は、BCI P 濃度が 70 mM の ALP 測定試薬に、前記標準血清 625  $\mu$ l を混合し、37°C で 3 日間反応したものである。

さらに、試料 3 は、BCIP 濃度が 6.25 mM の ALP 測定試薬に、前記標準血清 625  $\mu$ l を混合し、37°C で 3 時間反応したものである。

さらに、試料 4 は、BCIP 濃度が 6.25 mM の ALP 測定試薬そのものである（前記標準血清は混合せず）。

5      測定装置には HORIBA LA-910 型レーザー回折／散乱式粒度分布測定装置を用いて、該装置のマニュアルにしたがって粒度分布測定を行った。具体的には、約 50 ml の精製水が入った前記測定装置付随の超音波分散バスに 10 ml の試料 1～4 を添加し、測定を行った。粒度分布の測定条件である相対屈折率は、1.26-0.00i とした。

10      測定の結果、ALP 測定試薬と標準血清とを混合し反応して得られたものの中には、前記反応の結果生成する BCI 2 が存在することが分かった。そして、その BCI 2 の粒子（微細結晶）は、おおよそ数百 nm の粒径を有することが分かった（第 16 図参照）。

15      また、粒度分布の測定結果より、数  $\mu$ m の大きさの粒子も存在することが明らかになった。ただし、反応時間が長時間である試料、すなわち、反応時間が 3 日間である試料 1, 2 の場合は、粒径が数百 nm の粒子が主に存在することから、数  $\mu$ m の大きさの粒子は BCIP であると考えられる。しかし、この BCIP の粒子が、どのような状態で存在するのかは不明である。

20      よって、熱レンズ検出法に適した測定試薬としては、測定試薬と生体成分由来試料との反応生成物として色素粒子を生成しないことが必要である。また、ALP 測定試薬の BCIP 濃度や反応時間も適切なものとする必要がある。

25      なお、測定試薬と生体成分由来試料との反応以前に、BCI 2 の粒子等の有色の微細結晶が存在することが好ましくないことは言うまでもない。

(ラクテートデヒドロゲナーゼ活性の定量測定について)

ラクテートデヒドロゲナーゼ (以降はLDHと記す) 活性を測定する場合は、LDH活性によってlactate とNAD<sup>+</sup>とを、pyruvateとNADHとに変化させ、さらに、NADHとNTBとをdiaphorase活性によってNAD<sup>+</sup>と不溶性diformazanとに定量的に変換する。そして、不溶性diformazanを0.1N-HClで可溶化して、570nmの波長で測定を行う。なお、Diaphoraseの代わりに、フェナジンメタサルフェート (以降はPMSと記す) を使用することもある。

可溶化した色素 (不溶性diformazan) は、吸収波長スペクトルから600nm以上の領域において十分に定量測定が可能である。

また、NTBの代わりに水溶性ホルマザン基質を応用する方法が、知られている (石山宗孝, 臨床検査, 41, 9, 995, 1997)。株式会社同仁化学研究所製の水溶性ホルマジンの中でもWST-4並びにWST-5は、溶液のpH変化に対してスペクトルの変化が認められない特性があり (石山宗孝, DOJIN News, 82, 10, 1996)、最大吸収波長が550nmであるが、吸収波長スペクトルから600nm以上の領域で定量測定が可能である。

また、WST-1, WST-3, WST-8は、最大吸収波長がそれぞれ438nm, 433nm, 460nmであり、600nm以上に吸収波長スペクトルが認められない。しかし、上記反応終了後にアルカリを用いてpHを大きくすることにより、600nm以上に吸収を有するようになるので (スペクトルシフト)、本発明の測定方法に適用することができる。

しかし、不溶性色素の可溶化やスペクトルシフトを目的に、強酸, 強アルカリによりpHの調製をマイクロチップ中で行ったり、溶媒等による不溶性色素の可溶化をマイクロチップ中に行ったりすることは、マイ

クロチップを構成するポリマー等に溶解等の損傷を生じさせる恐れがある。そうすると、キャピラリの断面積等が変化し、キャピラリ内を流動する液体の流量が経時変化する恐れがあり好ましくない。

そこで、水溶性基質として、W S T - 4 及びW S T - 5 を応用した。

- 5 本発明者は、W S T - 4 及びW S T - 5 を使用することによって、臨床検査において測定されるL D H活性の範囲における本発明の測定方法の有効性を示すことができた。

次に、過酸化水素を経由しない反応系の例を示し、本発明の測定方法の有効性を示す。

- 10 (血液総蛋白の定量測定について)

測定対象物質から過酸化水素を誘導する反応を用いることなく血液総蛋白(以降はT Pと記す)を測定する方法としては、ビュレット比色法による方法がある。これは、アルカリ雰囲気中で、C uイオンとペプチド鎖中の窒素原子との錯体発色を、5 4 0 ~ 5 5 0 n mの波長において

15 定量測定を行うものである。

- また、ピロガロールレッド色素を用いた6 0 0 n mにおける定量方法も一般的である(体外診断用医薬品集、薬事日報社1997)。しかし、ピロガロールレッド色素を用いた測定法は、定量測定できる血液総蛋白の濃度が低く、血液中のT P測定を行うためには血液を千倍以上希釈する
- 20 必要がある。

マイクロチップ中での定量的な希釈は可能である。しかし、千倍以上の希釈を行うには、マイクロチップ中に設ける希釈用のリザーバが大きくなりすぎることから、現実的には不可能である。

- 本発明者は、ビュレット比色法の測定試薬の市販品(カイノスオート
- 25 シリーズT P試薬、カイノス株式会社製)の吸光度スペクトルを確認し、6 3 5 n mにおけるT Pの定量測定が可能なことを見いだした。

(尿素窒素の定量測定について)

- 5 血液中の尿素窒素を測定する方法としては、ジアセチルモノオキシム法、ウレアーゼ・インドフェノール法、ウレアーゼ・UV法、酵素法により過酸化水素を定量的に生成させ定量する方法等がある。一般的には、ウレアーゼ・インドフェノール法が最も使用されている（体外診断用医薬品集，薬事日報社1997）。

ウレアーゼ・インドフェノール法は、測定対象物質から過酸化水素を誘導する反応を用いることがない方法であって、570 nmの吸収波長で定量測定を行うものである。

- 10 本発明者は、ウレアーゼ・インドフェノール法の測定試薬の市販品（自動分析用試薬 「生研」 UN-I、デンカ生研株式会社製）を用い、ウレアーゼ・インドフェノール法のスペクトルを確認し、635 nmにおける尿素窒素の定量測定が可能なことを見出した。

(総ビリルビンの定量測定について)

- 15 血液中の総ビリルビン測定する方法としては、ジアゾ色素とビリルビンとを結合させてアゾビリルビン生成するジアゾ法や、ビリルビンオキシダーゼによりビリルビンを酸化する酵素法が一般的である（体外診断用医薬品集，薬事日報社1997）。

- 20 しかし、酵素法はビリルビンの酸化により特有の吸収波長（450 nm付近）が減少することを利用して定量を行っていることから、本発明の測定方法に用いることはできない。

本発明者は、アルカリアゾビリルビン法（測定波長：600 nm）を用い、600 nm以上の領域で定量測定が可能なことを確認した。

( $\gamma$ -GTP活性の定量測定について)

- 25 血液中の $\gamma$ -GTP活性を測定する方法としては、p-ニトロアニリド法又はカルボキシ-p-ニトロアニリド法（405～415 nm）、

3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリド法 (410~635 nm)、ジメチルアミノアニリド法又はジエチルアミノアニリド法 (660 nm)、 $\gamma$ -Glu-DBHA法 (600~610 nm) 等が一般的である (体外診断用医薬品集, 薬事日報社1997)。

- 5       しかし、p-ニトロアニリド法又はカルボキシ-p-ニトロアニリド法は、反応生成物の吸収波長の点で本発明の測定方法には適用できない。3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリド法、ジメチルアミノアニリド法又はジエチルアミノアニリド法、 $\gamma$ -Glu-DBHA法は、測定対象物質から過酸化水素を誘導する反応を用いることがない方法であって、  
10       本発明の測定方法に適用可能である。

本発明者は、 $\gamma$ -Glu-DBHA法が本発明の測定方法に適応可能であることを確認した。

(アルブミンの定量測定について)

- 血液中のアルブミンを測定する方法としては、プロモクレゾールグリーン法 (以降はBCG法と記す) 若しくはプロモクレゾールパープル法  
15       (以降はBCP法と記す) が一般的である (体外診断用医薬品集, 薬事日報社1997)。

- 何れの方法も、アルブミンに色素を結合させることによりアルブミンを発色させて、定量を行うものである。これらの方法は、測定対象物質  
20       から過酸化水素を誘導する反応を用いることがない方法であり、また600 nm以上の波長領域で測定が可能である。

本発明者は、BCG法が本発明の測定方法に適応可能であることを確認した。

(過酸化水素を経由する測定項目に関する例)

- 25       例として、過酸化水素の生成を経由して測定対象物質を定量測定する反応に、本発明の測定方法が有用であることを述べる。



まず、測定対象物質に特異的な酵素による反応によって、過酸化水素を生成する。そして、この過酸化水素によって、ペルオキシダーゼ活性を介し4-AAと色源素とを酸化縮合する。この時、適当な色源素を選択することによって、発色する波長を選ぶことができる。すなわち、600nm以上の波長領域で測定することが可能となる。

以下に、8つの具体例を述べる。

＜アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼの活性の定量方法＞

血液中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（以降はASTと記す）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（以降はALTと記す）の活性の定量方法としては、UVによる測定法、ビルビン酸オキシダーゼ（以降はPOPと記す）-ペルオキシダーゼ（以降はPODと記す）法、ホルマザン比色法、ライトマン-フランケル法等が知られている（体外診断用医薬品集、薬事日報社1997）。

本発明者は、POP-POD法の測定試薬の市販品（TALNカインス：カインス株式会社）の一部を改変した物を本発明の測定方法に適應して、AST、ALTの活性の定量が可能であることを確認した。

＜尿酸の定量方法＞

血液中の尿酸の定量方法としては、ウリカーゼ-POD法、ウリカーゼ・カタラーゼ法などが知られている（体外診断用医薬品集、薬事日報社、1997）。

本発明者は、ウリカーゼ-POD法の測定試薬の市販品（イアトロクUA、ヤترون株式会社）を本発明の測定方法に適應して、尿酸の定量が可能であることを確認した。

＜グルコースの定量方法＞

血液中のグルコースの定量方法としては、ブドウ糖酸化酵素比色法、

UV法等が知られている（体外診断用医薬品集，薬事日報社，1997）。

本発明者は、ブドウ糖酸化酵素比色法の測定試薬の市販品（デタミナーG L-E、協和メデックス株式会社）を本発明の測定方法に適応して、グルコースの定量が可能であることを確認した。

5      <総コレステロールの定量方法>

血液中の総コレステロールの定量方法としては、コレステロールオキシダーゼ法等が知られている（体外診断用医薬品集，薬事日報社，1997）。

本発明者は、コレステロールオキシダーゼ法の測定試薬の市販品（H  
10      A    テストワコー    コレステロール    E-HA    テストワコー、和光純  
薬工業株式会社）を本発明の測定方法に適応して、総コレステロールの  
定量が可能であることを確認した。

<HDL-コレステロールの定量方法>

血液中のHDL-コレステロールの定量方法としては、直接法やデキ  
15      ストラン硫酸Mg・リタングステン酸Mg法が知られている（体外診  
断用医薬品集'99追補版，薬事日報，1999）。

本発明者は、直接法の測定試薬の市販品（コレステスト HDL、第一  
化学薬品株式会社）を本発明の測定方法に適応して、HDL-コレス  
テロールの定量が可能であることを確認した。

20      <LDL-コレステロールの定量方法>

血液中のLDL-コレステロールの定量方法としては、直接法が知ら  
れている（体外診断用医薬品集'99追補版，薬事日報，1999）。

本発明者は、直接法の測定試薬の市販品（LDL-EX、デンカ生研  
株式会社）を本発明の測定方法に適応して、LDL-コレステロールの  
25      定量が可能であることを確認した。

<中性脂肪の定量方法>

血液中の中性脂肪の定量方法としては、酵素比色法等が知られている（体外診断用医薬品集，薬事日報社，1997）。

- 5 本発明者は、酵素比色法の測定試薬の市販品（自動分析装置用試薬－H R トリグリセライド－H R、和光純薬工業株式会社）を本発明の測定方法に適応して、中性脂肪の定量が可能であることを確認した。

#### ＜クレアチニンの定量方法＞

血液中のクレアチニンの定量方法としては、ヤッフエ法，酵素比色法，酵素U V法等が知られている（体外診断用医薬品集，薬事日報社，1997）。

- 10 本発明者は、酵素比色法の測定試薬の市販品（Lタイプワコー クレアチニンF、和光純薬工業株式会社）を本発明の測定方法に適応して、クレアチニンの定量が可能であることを確認した。

（熱レンズ検出法の乳び耐性について）

- 15 励起光の波長に特異的な吸収を示さない直径数十nm程度の微粒子、例えば乳びに対して、熱レンズ検出法が耐性を有することを示す例を述べる。

- 20 乳びの度合いを定量化するために干渉チェック・Aプラス（国際試薬株式会社）を用いた。一般的に強乳びとされる2100ホルマジン度の血清（検体）を、サイトロールA（日水製薬株式会社）を用い仕様書に従って作製した。そして、H A テストワコー コレステロール E－H A テストワコー（和光純薬工業株式会社）を検体に反応させた後、熱レンズ検出法及び吸光度法（635nm）により測定を行った。

- 25 その結果、吸光度法ではバックグラウンドが生じるが、熱レンズ検出法では乳びの影響が生じないことを確認した。この結果より、熱レンズ検出法は乳びに対して耐性を有することが分かった。

（励起光及びプローブ光について）

本発明者等が、励起光に 633 nm の波長を持つ He-Ne レーザーを用い、プローブ光に 488 nm の波長を持つ Ar レーザーを用いて、熱レンズ検出法によるヘモグロビンの測定を行ったところ、後述する参考例 1 に記したように、熱レンズ検出法による出力が異常に大きく、且つ経時的に上昇するという現象が見られた。

この励起光とプローブ光との組み合わせは、コレステロールなどの生化学項目を DAOS などの色素に誘導して測定した場合には、問題なく熱レンズ検出法による出力が検出でき、定量できた組み合わせである。

このことは、例えば、国際公開 WO 99-64846 号（国際出願 PCT/JP 99/03158 明細書、「分析装置」）、日本国特許公開公報 平成 12 年第 2675 号（日本国特許願 平成 10 年第 181587 号明細書、「キャピラリ光熱変換分析装置」）、日本国特許公開公報 平成 12 年第 2677 号（日本国特許願 平成 10 年第 167603 号明細書、「分析装置」）、日本国特許願 平成 10 年第 181586 号明細書（「混合分析装置及び混合分析方法」）、日本国特許願 平成 10 年第 167603 号明細書（「分析装置」）等に記載されている。

本発明者らが種々検討した結果、488 nm 及び 633 nm の両方の波長の光がメトヘモグロビンに照射されると、光反応が起こり異常値となることがわかった。そこで、プローブ光を励起光より長波長の、メトヘモグロビンが吸収しない波長であるレーザーに変えたところ、正常な熱レンズ検出法による出力が得られ、ヘモグロビンの定量が可能であった。

ヘモグロビンの測定のために本発明で用いる励起光の光源は、メトヘモグロビンの 630 nm の吸収帯を励起できる波長を有し、熱レンズを形成させるのに十分な出力を備えたものが必要である。励起光の波長は、メトヘモグロビンの吸収から、610 nm～650 nm が好ましく、よ

り好ましくは、 $630\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ である。励起光の光源は、 $630\text{ nm}$ 付近に励起に必要な光度を持つものなら、特に限定されない。

例えば、キセノンランプなどから必要とする波長の光をプリズムを用いて取り出してもよいが、分光すると出力が小さくなってしまう。

- 5      測定対象物質を励起することが可能な波長を有するレーザー又は十分な出力を備えた発光ダイオードでもよい。レーザーとしては $633\text{ nm}$ のHe-Neレーザーなども用いられるが、半導体レーザーを用いると検出装置が小さくなり、POC分析等の用途に適する。半導体レーザーとしては、東芝社製TOLD9450MC等の $650\text{ nm}$ の波長のもの
- 10      も用いられるが、より好ましい励起光の光源としては、シャープ社製LT050MSや、三洋電機社製DL-3088-011、DL4038-025等の $635\text{ nm}$ の波長の半導体レーザーがあげられる。

- ヘモグロビン測定におけるプローブ光の波長は、前述したように $600\text{ nm}$ より長波長が好ましく、より好ましくは励起光の波長の $630\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ よりも長波長のものである。 $1064\text{ nm}$ のYAGレーザーや、 $900 \sim 1200\text{ nm}$ に100本程度の発振線をもつ炭酸ガスレーザー等も使用できるが、日本科学エンジニアリング社製LDT7830や三洋電機社製DL-4034-151等の $780\text{ nm}$ の波長を有する半導体レーザーがより好ましい。三洋電機社製DL-7032-00
- 15      1やシャープ社製LT015PDや日立社製HL8325G等の、 $830\text{ nm}$ の波長を有する半導体レーザーも好ましく使用できる。なお、励起光、プローブ光ともにキャピラリ付近に焦点を結ぶようにするために、集光レンズが必要である。
- 20      以上述べた励起光の光源及びプローブ光の光源は、ヘモグロビン以外

- 25      のものを測定する場合にも用いることができる。

熱レンズによるプローブ光の変化は、フォトダイオード、CCDカメ

ラ、光電子倍增管などで捉えられる。特に、フォトダイオードが検出装置の小型化には適している。

励起光はチョッパー等で0.1～20m秒程度のパルス光（周波数50Hz～10000Hz）とされ、そのチョッパーと同調するロックインアンプなどで、プローブ光の変化のみを取り出すようになっている。  
5 より好ましいチョッパーの周波数は100Hzから4000Hzである。

ロックインアンプの構造は、単機能の半導体素子などで簡略化が可能である。また、励起光のパルス化は、半導体レーザーを電氣的に変調させることにより行ってもよい。また、プローブ光の検出の際、一般には  
10 ロックインアンプを用いるが、日本国特許公開公報 平成9年第229883号に開示される暗視野型光熱変換分光分析装置の方法を用いてもよい。すなわち、遮蔽板でポンプ光及びプローブ光の光軸付近の光束を遮蔽し、熱レンズによって発散されたプローブ光のみを検出する手段である。

15 チョッパーによりパルス光となった励起光によって形成される熱レンズの変化を、プローブ光で検出する際には、プローブ光中の振動成分（励起光のパルスと同一周波数）のみを検出することとなる。よって、散乱などによって光の絶対量  $I$  が減少しても、光量  $I$  に対する振動成分  $i$  の比（ $i/I$ ）は不変となり、安定して正しい値を得ることが可能となる。  
20 なる。

（マイクロチップについて）

本発明のヘモグロビンの測定方法において使用されるマイクロチップは、その内部に血液試料や測定試薬等が流れるキャピラリを有していれば、その構成等は特に限定されるものではない。

25 例えば、以下のようなマイクロチップは本発明における好ましい形態の一つである。すなわち、マイクロチップが一对の平板状部材から構成

されているものである。一対の平板状部材のうち少なくとも一方は、表面に液体が流れる溝を有している。そして、該平板状部材の前記溝を内側にして2つの平板状部材を貼り合わせるることにより、内部にキャピラリを形成している。

- 5       このようなマイクロチップは、シリコン、ガラス等の無機材料や有機ポリマーで製造することができる。ただし、熱レンズ検出法の検出部分は、励起光及びプローブ光に対して透明であることが必要である。

10       マイクロチップをシリコンやガラスで製造する場合は、ガラス、石英もしくはSiの基板にエッチング保護膜（Cr等）を真空蒸着等の方法で数百nmの厚さに製膜を行う。そして、その上にパターンニングレジストをスピナー等を用いて塗布する。その後、フォトリソ用マスクを用いて、紫外光にてレジストを露光し、続いて現像（未硬化部分を溶剤で除去）して、所望の形状にパターンニングする。

- 15       次に、パターンニングされたレジストをエッチングマスクとして、エッチング保護膜をフェリシアン化カリウム水溶液等で溶解除去しパターンニングする。続いて、パターンニングされたレジスト及びエッチング保護膜をマスクとして、基板を例えばフッ酸水溶液にてエッチングして溝を形成する。その後、レジスト及び保護膜をエッチング除去する。また、上記基板とは別に、レーザーや超音波加工等の方法で貫通孔を開けたガラス等の基板を準備する。

20       最後に、溝を設けた基板と貫通孔を有する基板とを、溝を内側にして張り合わせ、例えば、真空炉中にて加熱（ガラス基板同士の場合には、600℃程度に数時間加熱）した後、自然冷却することで融着しマイクロチップを作ることができる。

- 25       マイクロチップを有機ポリマーで製造する場合は、光学的検出を行うので、測定に用いられる波長の光に対して透明性を有する樹脂を使用す

る必要がある。例えば、光熱変換検出法による測定の場合は、ASTM D 1003で測定される樹脂の光線透過率が、600 nm～800 nmの波長範囲で、80%以上、好ましくは90%以上のものが好適に使用できる。上記の光線透過率は、マイクロチップの表面での反射率及び  
5 有機ポリマー基材そのものによる吸収率の総和を、100%から減じた値である。

マイクロチップの表面などで散乱される光は、有機ポリマーに対しては何の効果も発揮しないのに対し、有機ポリマー基材によって吸収される光は、有機ポリマーに対しても熱を発生させる効果を有する。よって、  
10 光が有機ポリマーを通過する際に熱レンズと同様な効果が生じ、熱レンズ検出法による出力のバックグラウンドとなるため、測定の誤差の原因となる。よって、マイクロチップの作成に先立って有機ポリマー材料の評価を行い、熱レンズ検出法に影響を及ぼさない透過率の範囲を調査する必要がある。

15 吸光度法により測定する場合は、有機ポリマーに10%程度吸収されたとしても、全体の光量を90%に低下させるにすぎないから、検出感度には大きな影響を及ぼさない。しかしながら、光熱変換検出法の場合は、10%以下の吸収であっても、有機ポリマー製のマイクロチップに形成される熱レンズのため、測定結果に大きな影響が出る。特に、測定  
20 対象物質の濃度が低く、且つキャピラリが細い（溝が浅い）というような、測定に高感度が要求される場合には、1%以下の吸収であっても、ときには0.5%以下のわずかな吸収であっても、測定結果に悪影響が出る恐れがある。

例えば、1 cmのキュベットでの吸光度が0.1程度の物質（液体）  
25 の測定を、仮に50  $\mu$ mのキャピラリを備えた有機ポリマー製のマイクロチップを用いて行ったとする（すなわち、光路長が50  $\mu$ m）。そう



すると、1 cmの光路長での吸光度0.1は、50  $\mu$ mのキャピラリでの吸収率0.103%に相当する。有機ポリマー製のマイクロチップの有機ポリマー部分による吸収（熱レンズの形成）を、この10倍まで許容するとすると、吸収率は1%、2倍までとすると吸収率は0.2%となる。

つまり、1 cmの光路長の場合の吸光度が0.1程度の測定を、本発明の測定方法で行うには、マイクロチップを形成する有機ポリマーによる光の吸収が1%以下、より好ましくは0.2%以下であることが望ましいということになる。

ただし、この値は、測定対象物質の濃度やキャピラリの細さの違い等により変化し得る。例えば、測定対象物質の濃度を高くすることによって、1 cmのキューベットでの吸光度を0.5程度まで上げれば、50  $\mu$ mのキャピラリでの吸収率0.342%に相当する。よって、有機ポリマー製のマイクロチップによる吸収（熱レンズの形成）をこの10倍まで許容するとすると、有機ポリマー製マイクロチップによる吸収率はおよそ3.5%、2倍までとすると吸収率は1%弱となる。

また、前記平板状部材に溝を設ける際の加工性も、樹脂の種類の選択において重要な要素である。加工性の面から良好に使用できるのは、一般の熔融加工可能な熱可塑性樹脂やUV硬化によって得られた樹脂があげられる。特に良好に使用できるのは、表面に溝を有する平板状部材を大量に且つ安価に成形できる点で、熔融加工可能な熱可塑性樹脂である。その中でも、非結晶性熱可塑性樹脂、非結晶性樹脂が主成分の熱可塑性ポリマーアロイ、あるいは結晶化度が低い一部の結晶性熱可塑性樹脂が好適である。

また、血液との親和性、特に凝集、凝固、及び血小板の活性化などが起こらないことも、好ましい材料の条件の一つである。

以上のような光の透過性と加工性とを満足し、特に良好に使用できるのは、具体的には、ポリスチレン、スチレン-アクリロニトリル共重合体等のスチレン系樹脂、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、メチルメタクリレート-スチレン共重合体等のメタクリル樹脂、ポリカーボネート (PC)、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリエーテルイミド、ポリアリレート、ポリメチルペンテン等である。

1, 3-シクロヘキサジエン系重合体も好適に用いられる。ホモポリマーとして使用することも可能であるが、共重合体として用いる場合は、1, 3-ブタジエン、イソプレン、1, 3-ペンタジエン、1, 3-ヘキサジエン等の鎖状共役ジエン系モノマー、スチレン、 $\alpha$ -メチルスチレン、p-メチルスチレン、1, 3-ジメチルスチレン、ビニルナフタレン、ビニルスチレン等のビニル芳香族系モノマー、メタクリル酸メチル、アクリル酸メチル、アクリロニトリル、メチルビニルケトン、 $\alpha$ -シアノアクリル酸メチル等の極性ビニルモノマー若しくはエチレンオキシド、プロピレンオキシド、環状ラクトン、環状ラクタム、環状シロキサン等の極性モノマー、又はエチレン、 $\alpha$ -オレフィン系モノマーとの共重合体があげられる。この場合の共重合比は重量比で1, 3-シクロヘキサジエンモノマー/コモノマー=75/25~100/0が好ましい。

20 光透過性の高いシクロヘキサジエン系ポリマーについては、日本国特許願 平成9年第277045号明細書や日本国特許願 平成10年第287007号明細書中に詳細に記述されている。該ポリマーは、200nm以上の波長においては吸収はほとんどない。

25 前記のような、溝を有する有機ポリマー製の平板状部材は、平板からの切削加工、レーザー等によるエッチング加工、型内でのモノマーやマクロモノマーのUV硬化や熱硬化、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工

等の方法により成形できる。良好に使用できる成形加工法としては、前記平板状部材を大量に且つ安価に成形加工できることから、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工があげられる。より良好に使用できるのは、金型を用いた熱可塑性樹脂の射出成形法、圧縮成形法、エンボス成形法である。

5 特に、樹脂の金型キャビティへの充填工程中に、金型に接する樹脂表面の固化温度を低下させつつ射出成形する射出成形法（日本国特許公開公報 平成10年第128783号、日本国特許願 平成10年第46665号明細書に開示されている）は、成形精度の高い微細な溝を有する  
10 平板状部材を生産性良く成形することができる。この射出成形方法の具体例としては、キャビティ内に炭酸ガスを満たしておき射出成形する方法があげられる。この場合の炭酸ガスの圧力は、10MPa以下、より好ましくは0.3～2MPaである。

また、成形直前に高周波誘導加熱で金型表面を加熱して成形する射出  
15 成形方法（日本国特許公告公報 昭和62年第58287号、米国特許第4439492号等に記載）や、成形直前に輻射加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法（成形加工シンポジア'95, 241<1995>、成形加工'96, 69<1996>、合成樹脂, 42巻  
（1）, 48<1992>等に記載）などの、金型表面を加熱して成形  
20 する射出成形方法も、本発明におけるマイクロチップの製造に好ましい成形方法である。

つまり、前記成形方法は、金型温度を低く設定し、高周波誘導加熱やハロゲンランプ等の熱源により成形直前に金型表面だけを選択的に加熱して、型表面転写性と成形サイクルとの両立をはかれる成形方法である  
25 からである。

このようなマイクロチップ成形用の金型は、鉄又は鉄を主成分とする

鋼材、アルミニウム、アルミニウムを主成分とする合金、亜鉛合金、ベリリウム-銅合金等の、一般に合成樹脂の成形に使用されている金属からなる金型が良好に使用できる。

5 金型作製方法の1つの例をあげる。まず、金属、プラスチック、シリコン、ガラス等の材料から、切削加工、エッチング加工、紫外線硬化樹脂のフォトリソグラフィ加工等の方法により、目的とする微細な溝を有する有機ポリマー製の平板状部材の表面形状を有する母型を1つ作成する。そして、この母型からニッケル等の電気化学的鋳造法により、金型が作製される。

10 また、日本国特許公開公報 平成6年第283830号のレジストパターンを形成する方法を用いて金型を作ることも可能である。金属基板にレジストパターンを形成した後、レジストの無い部分を金属メッキで埋める。そして、レジストを除去して、基板表面に微細なパターンを施した金属板を形成する。この金属板を金型として、樹脂や焼結ガラスなどの加工を行うことが可能である。

本発明において使用される有機ポリマー製のマイクロチップを、前述の日本国特許公開公報 平成6年第283830号の回路基板を製造する方法に基づいて製造することも可能である。

20 また、ガラス基板を使用してマイクロチップを製造する場合、ガラス基板上にレジストパターンを形成して、サンド・ブラスト法でガラス基板を加工する方法があげられる。この方法によれば、飛来する粒子の方向が厚いレジストにより垂直方向に揃うため、通常の薄いレジストに比べてシャープな加工が可能で、高アスペクト比の溝を作ることができる。

25 さらに、ガラスや樹脂基板上に感光性レジストを塗布し溝以外の部分を露光した後、未硬化部分を除去して、溝の形状のレジストパターンを基板上に形成する手法も採用可能である。

さらにまた、レーザー等で両面を貫通する溝を設けたガラス平板を、別の2枚のガラス平板で挟むことによっても、本発明において使用されるマイクロチップを製造することが可能である。

5 また、ガラス基板上にレジストパターンを形成した後、フッ化水素などによるウェットエッチングによって、ガラス基板上に溝を形成する方法も用いることができる。

また、溝を有する平板状部材からなる前記マイクロチップは、溝の内面をポリエチレングリコールなどで蛋白吸着防止処理をしてもよい。また、後述する電気浸透流を送液手段として使う場合は、安定した電気浸透流を発生させるための表面処理を行ってもよい。

10 本発明におけるマイクロチップとしては、2枚の平板状部材から構成されるものが好ましい。その少なくとも一方は上記のような溝を有していて、該溝を有する面を内側にして他方の平板状部材と貼り合わせる。そして、超音波融着、熱融着、ホットメルト接着剤やUV接着剤等の接着剤による接着、粘着剤による粘着、直接又は薄い弾性シートを介して

15 の圧接等の方法で一体化して作られる。

溝を有していない平板状部材（以降は、被せ平板と記す）の材料は、上記溝を有する平板状部材に用いられる材料の中から選ぶことができる。また、薄いガラス板なども用いることができる。2つの平板状部材の材料は、同じ材料でもよいし、異なる材料であってもよい。厚みは、測定

20 の障害になることがなければ、特に限定されるものではないが、0.05～数mm程度が好ましい。どのような材料を用いる場合でも、熱レンズ検出法による検出部においては、励起光及びプローブ光の吸収率が、前述のように5%以下、より好ましくは1%以下であることが重要である。

25

また、本発明におけるマイクロチップの構成は、加工生産性の点から

は、上記のように2枚の平板状部材から構造されることが好ましい。そして、その少なくとも一方は溝を有していて、該溝を有する面を内側に  
して他方の平板状部材と貼り合わせた構造をとることが好ましい。ただし、貫通溝をもつ平板状部材を、他の平板状部材2枚で挟んで溝を形成  
5 させた3枚構成とすることも可能である。

前記被せ平板には、リザーバ用の貫通孔があいていてもよいし、被せ  
平板から突起する形で円筒形のリザーバ（廃液溜めを含む）が装着され  
ていてもよい。このリザーバの大きさは特に限定されるものではないが、  
高さが1～数mm、径が1～数mm程度が好ましい。溝を有する平板状  
10 部材や被せ平板が、数mm程度の厚みを有する場合、該貫通孔が液溜め  
を兼ねることもできる。

なお、本発明における流量とは、溝（キャピラリ）中を一定時間内に  
移動する液体の体積を意味する。

また、前記平板状部材の表面に有する液体の流れる溝の断面形状は、  
15 四角形であることが好ましいが、三角形等の他の多角形の形状、半円形、  
半楕円形等、他の形状でもよい。また、マイクロチップが何種類かの異  
なった形状の溝を組み合わせてなる流路を有していてもよい。ただし、  
熱レンズ検出法による検出部に関しては、溝の断面形状は長方形である  
ことが好ましい。なお、溝の上面（開放面）の幅は、溝の下面（底）の  
20 幅と同じであるか、又は広くてもよい。

また、この溝は、あまり小さすぎると、測定試料等に混入した微粒子  
がや血球などにより目詰まりが生じる原因となる。また、あまり大き  
すぎると、二液が合流した際の拡散による混合の効率が低下する。そのた  
め、血液試料の通過部分は、幅が20～500 $\mu$ m、深さが20～10  
25 00 $\mu$ mであることが必要である。好ましくは、幅が50～300 $\mu$ m、  
深さが30～200 $\mu$ mである。

ヘモグロビン測定などで血球を溶血する場合は、溶血した後の流路は、幅が $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、深さが $0.1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、断面積が $1 \sim 1,000,000 \mu\text{m}^2$ であることが好ましい。さらに好ましくは、幅が $30 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、深さが $20 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、断面積が $600 \sim 1,000,000 \mu\text{m}^2$ であり、幅は深さと同等以上である。

前記平板状部材の溝の寸法精度は、極微量成分の分析や定量分析等を行う上では、優れていることが好ましい。すなわち、溝の寸法精度（寸法転写精度）は、操作の精度及び個々の分析装置間の再現性を得るため、設計寸法に対し、幅及び深さが $\pm 5\%$ 以内、断面積が $\pm 7\%$ 以内であることが好ましい。また、高精度の定量分析を行うためには、幅及び深さが $\pm 2\%$ 以内、断面積が $\pm 4\%$ 以内の寸法精度を有することが、さらに好ましい。

（送液方法について）

本発明においては、マイクロチップ内での定量反応を、マイクロチップ内又は外で、血液試料と測定試薬とを計量槽によって各々一定量秤取して混合することにより行うことができる。あるいは、測定試薬に対する血液試料の流量比を制御することによって、測定試薬と血液試料とを一定比率で混合し、少なくとも一定時間以上連続的に反応する方法により行うこともできる（前述の日本国特許願 平成10年第181586号明細書、「混合分析装置及び混合分析方法」）。

送液方法としては、チップ外のポンプや遠心力や重力を送液手段とする方法を用いることができる。

また、溝（キャピラリ）中の液体に電界を印加して、電気泳動や、電気浸透流によって送液を行うこともできる（「キャピラリ電気泳動」、講談社等に詳しく記載されている）。

電気浸透流は、キャピラリ内面の表面のイオンの移動によってキャピ

5      ラリ内の液体が一緒に移動するものである。キャピラリがガラスやシリ  
コンで形成される場合は、ガラス表面のケイ酸のプロトンなどが移動力  
となる。また、PMMAやPCなどの有機ポリマー等からなるマイクロ  
チップで、キャピラリ内面に特別のイオン種が存在しない場合でも、  
10      キャピラリ内を流す液体の組成によっては、その液体中の電解質をキャピ  
ラリ内面に吸着させ、その電解質の移動により電気浸透流を生じさせる  
ことができる。安定した電気浸透流を発生させるため、キャピラリ内面  
の表面に、スルホン酸基やカルボン酸基を有する有機ポリマーをグラフ  
ト重合などで付加してもよい。また、水酸化ナトリウム水溶液等で、P  
10      MMAなどの表面を加水分解して、キャピラリ内面の表面にカルボン酸  
基を形成することも有効である。

電気浸透流では、電圧の制御により、細かく即応的に、また、設定し  
たプログラムに従って正確な流量を制御できる。したがって、マイクロ  
チップ内での反応や分離を、精度良く制御できるので好ましい。

15      電気浸透流を発生させる電源としては、高電圧電源装置（例えば、Mo  
del HCZE-30PN0,25、松定プレシジョン、30kVまで印加可能）を用  
いる。高電圧電源装置は、インターフェイスボード（例えば、DAQCard  
-1200, CB-50コネクタブロック、ナショナルインスツルメント）を介  
して外部のコンピューターから出力制御できる。電圧の印加のタイミン  
20      グ等のプログラムは、例えばNI-DAQドライブソフトウェア（LabVIEW）などで作製できる。

重力を駆動力として送液を行うことも可能であり、この送液法につい  
ては、本出願人により出願されている（日本国特許願 平成11年第3  
52445号明細書）。

25      （マイクロチップのキャピラリ（流路）形態について）

測定試薬や血液試料の混合や希釈を主な目的としたマイクロチップの



- 流路（キャピラリ）の形状には、1本の流路に他の流路を合流させた形状や、1本の流路に複数本の流路を一カ所で合流させた形状を採用することができる。1本の流路に他の流路又は複数の流路を合流させ一本の流路とすることにより、混合操作や希釈操作を行うことができる。また、
- 5 この時、各々の流量を変えることにより、異なった比率での混合や希釈も可能である。

- 混合や希釈の比率は、送液方法がポンプによる場合には、合流する各流路の流量を機械的に変えることにより決定することができる。また、電気浸透流による場合には、合流する各流路の断面サイズや長さを変え
- 10 たり、各流路への電圧のかけ方を変えたり、各流路のキャピラリ内表面の荷電状態を表面処理等により変えることにより、合流する各流路の流量を調節することができる。

また、遠心力による送液では、中心からの距離、回転数なども考慮して流路設計をする必要がある。

- 15 血液試料と測定試薬とを反応させた後、分離のために一定量を秤取することなく、混合から反応、測定まで一貫した流路で連続的に処理が可能である。

- このような、流量比で混合比率を規定する方法は、反応を長時間連続的に行う必要はない。例えば、混合に10秒かかるとしたら、最低10
- 20 秒間（通常はやや多めに20秒程度）、血液試料と測定試薬との合流を行い、この血液試料と測定試薬との混合物を、反応に十分な時間だけ流路内を移動させ、その後他の測定試薬との合流を同じく最低10秒間行えばよい。そして、それから必要時間、流路中を流して反応させてから測定を行う。

- 25 また、マイクロチップ中に計量槽（メスシリンダー）を設けて、この計量槽にて血液試料や測定試薬を計り取り、それを混合して熱レンズ検

出装置に供することもできる。

本発明においては、血液試料と測定試薬との反応は、混合のため、反応の完結のために、2～10分の時間を取ることが好ましい。

5 (実験例1：血液試料と測定試薬との混合比及び酸化剤濃度についての検討)

熱レンズ検出法の必要条件として、波長633nmの励起光の吸光度に対する測定試薬の混合比の影響を検討した。測定試薬(溶血酸化試薬液)としては、フェリシアン化カリウム( $K_3Fe(CN)_6$ )、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸(以降はMESと記す)、トリトンX-100を、それぞれ0.61mM、10mM、0.8重量%  
10 の濃度で溶解させた溶液(pH6.0)を用いた。

血液試料は健常人からヘパリン採血したものを用いた。血液試料と上記測定試薬との混合比が1:250の場合では、血液試料4 $\mu$ lに対し上記測定試薬を996 $\mu$ l、混合比1:415では、PBS(燐酸緩衝液)で60%に希釈した血液試料4 $\mu$ lに対し上記測定試薬を996 $\mu$ l  
15  $\mu$ l、混合比1:1245では、PBSで20%に希釈した血液試料4 $\mu$ lに対し上記測定試薬を996 $\mu$ l添加した。

添加直後からの経時的な吸光度変化を、第1図(混合比1:250)、第2図(混合比1:415)、第3図(混合比1:1245)に示す。  
20 添加直後に比べて、1200秒(20分)後の吸光度の低下は、混合比1:250で8.5%、混合比1:415で16.3%、混合比1:1245で31%であった。

混合比を1:4にした場合は、上記測定試薬800 $\mu$ lと血液試料200 $\mu$ lを混合して室温下で5分放置しても、第4図に示すように、メ  
25 トヘモグロビンへの酸化が不十分であった。

そこで、測定試薬中の酸化剤の濃度を上げて、フェリシアン化カリウ

ム、MES、トリトンX-100の濃度を、それぞれ10 mM、12.5 mM、1重量%とした(pH 6.0)。

血液試料200  $\mu$ lとこの酸化剤の濃度を上げた測定試薬800  $\mu$ lとを混合し、5分後の吸光度を測定した。その結果、第5図に示すように、ヘモグロビンの酸化が進んでいた。この条件での、混合後30秒後、10分後、20分後の吸収スペクトルを第6図に示す。この場合の混合直後に比べた1200秒(20分)後の吸光度の低下は、2.9%と安定であった。

(実験例2：pH値の影響についての検討)

フェリシアン化カリウム、トリトンX-100を、それぞれ0.61 mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液を測定試薬として用いて、pH値の検討を行った。pH値は、以下に示すpH値調整用の試薬を用いて調整した。pH 2及びpH 4は、10 mMクエン酸バッファーをNaOHで調整したもの、pH 6は10 mMのMESバッファー、pH 8は10 mMのTRIZMA(シグマ社製)バッファー、pH 10は約1 mMのNaOH溶液、pH 12は約10 mMのNaOH溶液を用いて、それぞれ調整した。

633 nmにおける吸光度を第7図に示した。メトヘモグロビンの吸収(630 nm)は、pH 2, 6, 10ではピークを示すが、pH 4, 8, 12ではショルダーとなり、ピークを示さなかった。700 nmにおけるバックグラウンド吸光度は、pH 2で0.34, pH 4で0.05, pH 6で0.02, pH 8で0.00, pH 10で0.00, pH 12で0.00であった。

かくして、本発明の物質の測定方法によれば、微量の検体、とりわけ血液や尿などの生体由来の検体から、ヘモグロビン等の物質の濃度測定が可能である。また、励起光として長波長のレーザーを用いることがで

きるため、熱レンズ検出装置が安価に製造でき、経済的である。したがって、本発明の物質の測定方法及び該測定方法に用いる測定試薬は、P O C分析等に好適な測定方法及び測定試薬である。

さらに、本発明のヘモグロビン測定方法は、毒物であるシアン化カリウム等のシアニドを測定試薬中に含有しないため、煩雑な廃液処理が不要である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1 : 250の場合の、635 nm (上の曲線) と780 nm (下の曲線) とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

第2図は、実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1 : 415の場合の、635 nm (上の曲線) と780 nm (下の曲線) とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

第3図は、実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1 : 1245の場合の、635 nm (上の曲線) と780 nm (下の曲線) とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

第4図は、実験例1において、血液試料と測定試薬とを1 : 4で混合し、5分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである (測定試薬中の酸化剤濃度は、第1図～第3図の場合と同じ)。

第5図は、実験例1において、血液試料と測定試薬とを1 : 4で混合し、5分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである (測定試薬中の酸化剤濃度を、第4図の場合より上げた場合)。

第6図は、実験例1において、血液試料と測定試薬とを1 : 4で混合した後の、測定試料の吸収スペクトルの経時変化である (測定試薬中の酸化剤濃度は、第5図の場合と同じ)。(a)は混合後30秒後、

(b) は 10 分後、(c) は 20 分後を示す。

第 7 図は、実験例 2 における、pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 の各条件下での測定試料の吸収スペクトルである。

5 第 8 図は、(a) は、実験例 3 における、ヘモグロビン濃度と熱レンズ検出法による出力の関係を示すグラフである。(b) は、(a) の横軸のヘモグロビン濃度の低濃度の部分を拡大したグラフである。なお、横軸上段の  $g/dl$  単位の数字は、血液試料中のヘモグロビン濃度を示し、横軸下段の  $\mu g/ml$  単位の数字は、測定試料中のヘモグロビン濃度を示す。

10 第 9 図は、有機ポリマー製のマイクロチップの流路形状を示す図である。

第 10 図は、ガラス製キュベット中での光熱変換検出法による ALP 活性の測定結果を示すグラフである。

15 第 11 図は、比較例 1 における光熱変換検出法による ALP 活性の測定結果を示す測定チャートである。

第 12 図は、吸光度法による ALP 活性の測定結果を示すグラフである。

第 13 図は、実施例 5 における送液系の構成を示す概略図である。

20 第 14 図は、第 13 図中のペリスタポンプの構成を説明する概略図である。

第 15 図は、樹脂製マイクロチップ中での光熱変換検出法による ALP 活性の測定結果を示すグラフである。

第 16 図は、BCI 2 の粒度分布の測定結果を示す図である。

25 第 17 図は、光熱変換検出法による LDH 活性の測定結果を示すグラフである。

第 18 図は、光熱変換検出法による総蛋白濃度の測定結果を示すグラ

フである。

第 19 図は、光熱変換検出法による尿素窒素濃度の測定結果を示すグラフである。

5 第 20 図は、光熱変換検出法による総ビリルビン濃度の測定結果を示すグラフである。

第 21 図は、光熱変換検出法によるγ-GTP 活性の測定結果を示すグラフである。

第 22 図は、光熱変換検出法によるアルブミン濃度の測定結果を示すグラフである。

10 第 23 図は、光熱変換検出法によるAST 活性の測定結果を示すグラフである。

第 24 図は、光熱変換検出法による尿酸濃度の測定結果を示すグラフである。

15 第 25 図は、光熱変換検出法によるグルコース濃度の測定結果を示すグラフである。

第 26 図は、光熱変換検出法による総コレステロール濃度の測定結果を示すグラフである。

第 27 図は、光熱変換検出法によるHDL-コレステロール濃度の測定結果を示すグラフである。

20 第 28 図は、光熱変換検出法によるLDL-コレステロール濃度の測定結果を示すグラフである。

第 29 図は、光熱変換検出法による中性脂肪濃度の測定結果を示すグラフである。

25 第 30 図は、光熱変換検出法によるクレアチニン濃度の測定結果を示すグラフである。

第 31 図は、乳びを呈する検体中の総コレステロール濃度の光熱変換

検出法による測定結果を示すグラフである。

第32図は、乳びを呈する検体中の総コレステロール濃度の吸光度法による測定結果を示すグラフである。

## 5 発明を実施するための最良の形態

### (実施例1)

He-Neレーザーを励起光として用いた熱レンズ検出法によるヘモグロビンの測定において、血液試料の希釈度合いと熱レンズ検出法による出力との直線性について検討を行った。以下に、その内容を説明する。

10 光熱変換検出装置の構成は、以下の通りである。顕微鏡にはステージ上での測定試料の取り扱いの容易さを勘案し、倒立型顕微鏡（IX70、Olympus製）を使用した。これは落射型の顕微鏡であっても構わない。この顕微鏡は、顕微鏡外の光学系により同軸にされたレーザー光を導入できるように改造を加えてある。

15 レーザーは、励起用にはHe-Neレーザー（633nm、10mW、エドモントサイエンティフィック製）を、検出用（プローブ光）には半導体レーザー（780nm、日本科学エンジニアリング社LDT7830）を使用した。ミラー、ビームエクspander等の光学系はメスグリオ社製品で統一した。

20 励起用のレーザー光はライトチョッパーにより変調された後、ダイクロイックミラーにより検出用レーザーと同軸にされ、顕微鏡に導かれ測定試料に照射される。測定試料を照射した後、同軸にされたレーザー光の内、励起光のみを選択的にフィルターにより除去しフォトセンサーに導く。レーザー光の受光部分の素子には、取り扱いの簡便性を考えファイバー付きのフォトセンサーアンプ（C6386、浜松ホトニクス社）  
25 を使用した。このフォトセンサー受光部は、ピンホールを持つカバ

一で覆われている。フォトセンサー及びセンサーアンプからの出力は低雑音プリアンプ（L I - 7 5 A、エヌエフ回路ブロック社製）で増幅された後、ロックインアンプに導かれ信号処理される。

5      このような熱レンズ検出装置を用いて、血液試料の希釈度合いとヘモグロビンの定量性との関係を、以下のように検討した。

ヘパリンを加えた健常人の血液（ヘモグロビン濃度は  $16 \text{ g/dl}$ ）を血液試料として用いた。測定試薬には、フェリシアン化カリウム、MES、トリトン X-100 を、それぞれ  $8 \text{ mM}$ 、 $10 \text{ mM}$ 、 $0.8$  重量%の濃度で溶解させた溶液（ $\text{pH } 6.0$ ）を用いた。

10      測定試料中のヘモグロビン（Hb）濃度が  $6400 \mu\text{g/ml}$  の場合は、血液試料  $40 \mu\text{l}$  に前記測定試薬を  $960 \mu\text{l}$  加え（混合比は  $1:24$ ）混合し、室温で5分以上静置した後に、熱レンズ検出法により測定した。測定試料中のHb濃度が  $640 \mu\text{g/ml}$  の場合は、血液試料  $4 \mu\text{l}$  に測定試薬  $996 \mu\text{l}$  を加え混合し、測定試料中のHb濃度が  $384 \mu\text{g/ml}$  の場合は、PBSで60%に希釈した血液試料  $4 \mu\text{l}$  に測定試薬  $996 \mu\text{l}$  を加え混合し、測定試料中のHb濃度が  $128 \mu\text{g/ml}$  の場合は、PBSで20%に希釈した血液試料  $4 \mu\text{l}$  に測定試薬  $996 \mu\text{l}$  を加え混合した。

20      こうして得られた各測定試料を、 $50 \mu\text{m}$ の深さ、数mmの幅の溝を持つ平板ガラス製キュベット（GL Sciences社製 Quartz Cell Type AB20-SQ-0.05）に移し、このキュベットを倒立顕微鏡のステージ上に設置した。このキュベットは、複雑な溝パターンを有するマイクロチップのモデル版として、幅広ではあるが溝深さはマイクロチップと同程度のものを採用した。熱レンズ検出法においては、溝の幅は数十  $\mu\text{m}$ 以上あれば、それより広くても大きな支障はない（ただし、溝内での拡散混合などには影響がある）。溝深さ



は、樹脂製のマイクロチップなどにおいては、金型の母型の製作の点から制限があり、熱レンズ検出法の感度にも大きな影響がある。よって、本実施例で用いた平板ガラス製キューベットと、後述する樹脂製のマイクロチップとは、ほぼ同程度の溝深さとした。

- 5        対物レンズの焦点合わせには、励起用レーザーを使用した。すなわち、モニター画面を参照しつつ、ガラス製キューベットの溝の縁辺の位置での焦点合わせを実施した。そして、その後、溝のほぼ中央部で熱レンズ検出を行った。

- 10        励起用レーザーは、ライトチョッパーにより 3 2 8 9 H z に変調され、メトヘモグロ빈を励起し発熱を生じさせた。このライトチョッパーによる変調の周波数は、S / N 比等の影響により変更することも有り得る。この発熱により発生した熱レンズにより検出用レーザーの焦点位置がずれ、それによりピンホールを通じたフォトセンサーの受光量が発熱量に応じ変化する。フォトセンサーからの信号はロックインアンプにより処理されるが、ここでは時定数として 1 秒を用い、ライトチョッパーと同じ周波数 3 2 8 9 H z の信号のみを選択的に出力として用いた。

この結果を第 8 図に示す。縦軸は熱レンズ検出法による出力の強度 (mV)、横軸上段は、血液試料中のヘモグロ빈濃度、横軸下段は、測定試薬を混合後の測定試料中のヘモグロ빈濃度である。

- 20        (実施例 2)

有機ポリマー製のマイクロチップを用い、励起光として 6 3 5 n m の半導体レーザーを用いて、血液試料中のヘモグロ빈の測定を行った。以下にその内容を説明する。

- 25        マイクロチップを構成する、表面に溝を有する平板状部材は、射出成形により成形した。射出成形に使用した樹脂は、メタクリル樹脂 (旭化成工業製デルベツト 8 0 N H) である。ガスとしては純度 9 9 % 以上

の二酸化炭素を使用し、その圧力は1 MP aとした。成形機は住友重機械工業製SG50を使用した。成形品は、厚み2 mmで、縦横が120 mm, 60 mmの平板状部材である。

5 この平板状部材の表面には、幅100  $\mu$ m, 深さ50  $\mu$ m, 長さ3 cmの直線状の溝が設けられている。そしてその溝の両端には、測定試料を導出入する貫通孔を設けるための円形溝（直径3 mm, 深さ50  $\mu$ m）が形成されている。その円形溝に、ドリル等により直径2 mmの貫通孔をあけて、測定試料の導出入部とした。

10 なお、金型の母型は、シリコンをRIEの手法でエッチングしたものや、DFR（ドライフィルムレジスト）で光硬化させたものが使用できる。母型を電鑄してスタンパーを作成後、平板状部材を射出成形して、これらを比較したところ、どちらの母型もほぼ同じ成形品が得られた。

15 また、金型の表面状態の転写性は、光学顕微鏡による観察及びレーザー顕微鏡による形状測定で評価する。また、成形品も、光学顕微鏡による観察、切断断面の溝形状の光学顕微鏡や電子顕微鏡での観察、レーザー顕微鏡による形状測定等で観察する。

20 こうして得られた平板状部材の溝を有する面に、200  $\mu$ m厚みのメタクリル樹脂シートに光硬化型接着剤を塗布したものを貼り合わせた。そして、UV光を照射して、両端のみが開放されたキャピラリを形成させ、これを測定用のマイクロチップとした。

光熱変換検出装置としては、基本的には実施例1に記載の装置を用いた。ただし、励起光用レーザーを、633 nmのHe-Neガスレーザーから635 nmの発光を持つ半導体レーザー（三洋電機社製DL-4038-025）に変え、それに伴い光学系を調整した。

25 測定試料としては、ヘパリンを加えた健常人血液（ヘモグロビン濃度は16 g/dl）を、測定試薬（フェリシアン化カリウム、MES、ト

リトンX-100を、それぞれ8 mM、10 mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液(pH 6.0))と混合し反応させたものを用いた。

すなわち、測定試料中のヘモグロビン濃度が $6400\mu\text{g}/\text{m}\ell$ の場合は、前記血液試料 $40\mu\ell$ に前記測定試薬を $960\mu\ell$ 加え混合し、  
5 測定試料中のヘモグロビン濃度が $640\mu\text{g}/\text{m}\ell$ の場合は、血液試料 $4\mu\ell$ にPBS-3-6 $\mu\ell$ を加えたものに測定試薬液9-9-6 $\mu\ell$ を加え混合し、それぞれ室温で5分以上静置したものを用いた。

これらの測定試料 $2\mu\ell$ (これに含まれている検体血液量は $40\text{n}\ell$ 及び $4\text{n}\ell$ )を、前述のように作成したマイクロチップの貫通孔からキャピラリに導入し、熱レンズ検出法による出力を測定した。その結果、  
10 ヘモグロビン濃度 $640\mu\text{g}/\text{m}\ell$ では $0.5\text{mV}$ 、 $6400\mu\text{g}/\text{m}\ell$ では $5\text{mV}$ 程度の出力が検出された。

### (実施例3)

次に、血液試料と測定試薬とを混合、反応させる測定試料の調製と、  
15 熱レンズ検出法による測定試料のヘモグロビン測定とを、有機ポリマー製のマイクロチップ中で行った例について、その内容を説明する。

光熱変換検出装置は、実施例2と同様のものを用いた。

また、マイクロチップについても、実施例2と同様の方法で作成した。  
まず、第9図のような表面に溝を有するPMMA製の平板状部材31を、  
20 射出成形により成形した。該平板状部材31の外形寸法は実施例2と同じである。そして、この平板状部材31の円形溝1, 2の部分に、ドリルで直径1mmの貫通孔をあけて、血液試料及び測定試薬の導入部とした。また、同様に、円形溝3の部分に貫通孔をあけて、廃液の導出部とした。

25 こうして得られた貫通孔を有する平板状部材31の溝を有する面に、厚み $200\mu\text{m}$ のメタクリル樹脂シートに光硬化型接着剤を塗布したも

のを貼り合わせた。そして、UV光を照射して、溝の端部のみが開放されたキャピラリを形成させ、これを測定用のマイクロチップとした。

第9図は、形成されたキャピラリの流路形状を示すものである。流路の端部には、血液試料用リザーバ1、測定試薬用リザーバ2、及び廃液溜め3が設けられており、両リザーバ1、2及び廃液溜め3の貫通孔部分を除く大きさは、直径3mm、深さ50 $\mu$ mである。

キャピラリ（流路）はすべて、深さ50 $\mu$ m、幅150 $\mu$ mであり、長さは、流路11が9mm、流路12が9mm、流路13が65mmである。流路13には、光熱変換検出法（熱レンズ検出法）による検出部21が設けてあり、流路11と流路12との合流点22から検出部21までの距離は60mmである。

測定試薬としては、フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100を、それぞれ8mM、10mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液（pH6.0）を用いた。血液試料としては、ヘパリンを加えた健常人血液（ヘモグロビン濃度は16g/dl）、及びそれをPBSで希釈してヘモグロビン濃度を10g/dlに調整したものを用いた。

25 $\mu$ lのマイクロシリンジ（ハミルトン社製）に血液試料を4 $\mu$ l取り、該マイクロシリンジをテフロンチューブにより、血液試料用リザーバ1の貫通孔に連結した。また、別のマイクロシリンジに測定試薬を20 $\mu$ l取り、該マイクロシリンジを別のテフロンチューブにより、測定試薬用リザーバ2の貫通孔に連結した。

両マイクロシリンジを2台のマイクロシリンジポンプ（ハーバード社製）に別々に装着し、血液試料の流速が0.2 $\mu$ l/hr、測定試薬の流速が4.8 $\mu$ l/hrになるように、各マイクロシリンジポンプを設定した。これで、血液試料と測定試薬との混合比は1:24となる。混合後の反応時間は、第9図の流路13を流れる時間であるので、5.4

分程度となる。

室温下で前記両マイクロシリンジポンプを駆動させ、熱レンズ検出法による出力を測定した。その結果、ヘモグロビン濃度  $16 \text{ g/dl}$  の血液試料で  $4.0 \text{ mV}$  程度の出力が得られ、ヘモグロビン濃度  $10 \text{ g/dl}$  に調整した希釈血液試料では、 $2.5 \text{ mV}$  程度の出力が得られた。

(参考例 1)

プローブ光の光源として、 $488 \text{ nm}$  に発光を持つ Ar レーザーを用いた以外は、実施例 1 と同様にして、ヘモグロビンの測定を行った。

血液試料としては、ヘパリンを加えた健常人 2 名の血液（ヘモグロビン濃度は  $16 \text{ g/dl}$ ）を、検体 1 及び検体 2 として用いた。これらの血液試料を PBS で  $60\%$ 、 $20\%$  になるように希釈し、 $0.6 \times$  検体、 $0.2 \times$  検体とした。この希釈検体又は希釈しない血液試料（ $1 \times$  検体） $4 \mu\text{l}$  に、測定試薬（フェリシアン化カリウム、MES、トリトン X-100 を、それぞれ  $0.61 \text{ mM}$ 、 $10 \text{ mM}$ 、 $0.8$  重量%の濃度で溶解させた溶液（ $\text{pH } 6.0$ ））を  $996 \mu\text{l}$  加え混合し、室温で 5 分以上静置した後熱レンズ検出法による測定を行った。

その結果を表 1 に示す。なお、表 1 中の数値はバックグラウンドを差し引いた後の熱レンズ検出法による出力である。

この結果から明らかなように、全体に熱レンズ検出法による出力が安定せず、特に希釈検体で異常な高値を示した。これらの現象は、前述の各実施例では見られなかったものである。

このような現象が起こる原因の一つとしては、 $633 \text{ nm}$  の励起光と、 $488 \text{ nm}$  のプローブ光とが同時に照射されることにより、ヘモグロビンの種々の励起状態が惹起され、エキサイプレックスのような光反応が生じたか、あるいは、血液中の他の成分が  $488 \text{ nm}$  の光を吸収して、ヘモグロビンと相互作用したことが考えられる。しかし、詳細は明かで

はない。

(表 1)

5	検体 1		検体 2
	20%希釈	200~300 mV	3 mVから10分後には 250 mVまで増加
10	60%希釈	2~6 mV	3~6 mV 漸増
	希釈なし	6 mV 不安定	3.1 mVで安定

15 (実施例 4)

本発明の一実施例として、光熱変換検出法により血清中のALP活性の定量測定を行った結果を示す。

(光熱変換検出系の構成)

20 光熱変換検出系（光熱変換検出装置）としては、実施例 1 と同じ基本構成のものを用いた。ヘモグロビン以外の物質の測定における該光熱変換検出系による測定の一般的な手順は、以下の通りである。

25 溝パターンを有する平板マイクロチップ（あるいは、測定試料を入れたガラス製のセル。該ガラス製のセルの深さは50, 100, 200, 500  $\mu\text{m}$ ）を倒立顕微鏡のステージ上に載置する。対物レンズの焦点合わせには励起用レーザーを使用し、モニター画面を参照しつつ溝パターンの上辺及び下辺の位置での焦点合わせを実施した後、その中間点を

溝の中心位置とした。

5 焦点合わせの後、前述したような検体と測定試薬との反応を行わせ、  
反応生成物を含む溶液を検出部分に導く。励起用レーザーはライトチョ  
ッパーにより 1170 Hz に変調され、溝内の反応生成物を励起し発熱  
を生じさせる。このライトチョッパーによる変調の周波数は、S/N 比  
等の影響により変更することも有り得る。

10 この発熱により発生した熱レンズにより検出用レーザーの焦点位置が  
ずれ、それによりピンホールを通じたフォトセンサーの受光量が発熱量  
に依り変化する。測定中は、測定試料は流動が停止した状態でも、流動  
している状態でも構わないが、本実施例では停止した状態で測定を行っ  
た。フォトセンサーからの信号はロックインアンプにより処理されるが、  
ここでは時定数として 1 秒を用い、ライトチョッパーと同じ周波数 11  
70 Hz の信号のみを選択的に出力として用いた。ロックインアンプの  
出力電圧は励起光により励起される反応生成物の濃度に比例するため、  
15 反応生成物の定量化が可能である。

(測定試薬の調製)

J S C C 常用基準法にしたがって、前述と同様に緩衝液 1 を作製した。  
そして、血液試料と反応させる直前に、基質として B C I P (和光純薬  
工業株式会社) を最終の濃度で 30, 15, 及び 7 mM になるように緩  
20 衝液 1 に溶解し、A L P 測定試薬 (測定試薬) を調整した。

(検体：標準血清の調製)

検体には、調製法を一部改変したサイトロール A (日水製薬株式会  
社) を用いた。具体的には、1 バイアルの凍結乾燥品を精製水 (共栄製  
薬株式会社) 2500  $\mu$ l で溶解し A L P 活性が、計算値で 302 IU  
25 / l になるように調製し、ストック溶液とした。次に、ストック溶液を  
精製水で希釈して、計算値で 101 IU/l 及び 51 IU/l の A L P

活性を含む溶液を調製した。そして、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

(ALP活性の検出)

ALP測定試薬1000 $\mu$ lと検体25 $\mu$ lとを試験管の中で十分混  
5 和し、37℃で正確に2分30秒間保温する。その後、該混合溶液(測定試料)を、50 $\mu$ mの深さを有する平板ガラス製キュベット(GL Sciences社製Quartz Cell Type AB20-SQ-0.05)に移し、このキュベットを37℃の空気恒温装置の付いた倒立顕微鏡のステージ上に設置する。対物レンズの焦点合わせは、  
10 ロックインアンプの出力値を見ながら、最高値を示す位置を指標に行う。

測定開始から約15分間の熱レンズ検出法による出力を前述のソフトウェアLabVIEWにより処理した。すなわち、得られた曲線を直線回帰し、回帰した直線の傾きを1秒あたりに生じた反応量として数値化した。この間、キュベットは、顕微鏡のステージ上で37℃に空気恒温  
15 されている。上記測定で得られた結果を、第10図に示す。

(比較例1)

本発明の一比較例として、不溶性の基質(BCI)の沈殿が生じることにより、熱レンズ検出法による測定が困難であった例を示す。

(光熱変換検出系の構成)

20 実施例4と同様の構成である。

(測定試薬の調整)

実施例4と同様に調整した。ただし、BCIP濃度は70mMとした。

(検体の調整)

実施例4と同様に調整した。ただし、ALP活性は800IU/lとした。  
25

(ALP活性の検出)



実施例 4 と同様にして行った。その結果、第 11 図に示すように、BCIP 濃度が 70 mM の ALP 測定試薬では、安定した熱レンズ検出法による出力が得られず、反応が生じた量を測定することができなかった。これに対して、BCIP 濃度が 15 mM の ALP 測定試薬では、経時的に安定した傾きの熱レンズ検出法による出力が得られた。

また、BCIP濃度が70 mMのALP測定試薬を4℃で数時間保冷した結果、BCIPの再結晶が認められた。この現象は、BCIP濃度が35 mMのALP測定試薬でも認められたが、BCIP濃度が15 mM以下のALP測定試薬では認められなかった。

10 このことから、熱レンズ検出法による出力が安定しなかった原因は、  
 有色の微細結晶が生成し、この微細結晶（微細粒子）により散乱が生じ  
 たためであると考えられた。

(比較例 2)

本発明の一比較例として、不溶性の基質（BCI）の微細結晶が生じた場合でも、吸光度測定は可能である例を示す。ALP測定試薬及び検体は、実施例4と同様にして調製したものをを用いた。吸光度計は、島津社UV2200を用いた。その結果、第12図に示すように、BCIP濃度が70mMのALP測定試薬を用いた場合でも検量線が得られた。

(实施例 5)

20 キャピラリー（溝）を備えた樹脂製のマイクロチップを用いて、ALP  
測定試薬及び検体の流量を制御しながらALP活性の定量を行った。送  
液及び流量の制御は、各液溜めに配管で連結されたマイクロシリンジを、  
直列に繋がれた一台のシリンジポンプとシリンジポンプを改良した微量  
ペリスタポンプとを用いて駆動することにより、機械的に行った。以下  
25 にその詳細を説明する。

(マイクロチップの作製)

マイクロチップは、実施例 3 とほぼ同様にして作製した。成形された平板状部材 3 1 の寸法は、縦 1 2 0 mm、横 8 0 mm、厚み 5 mm で、第 9 図と同様のパターンの溝が形成されている。

5 液溜め 1 ~ 3 の部分には、直径 1 . 5 mm の貫通孔がドリル等により設けられている。液溜め 1 は検体用、液溜め 2 は測定試薬用、液溜め 3 は廃液用である。なお、測定試薬を 2 種類用いて測定する場合は、溝 1 3 の合流点 2 2 と検出部 2 1 との間の適切な位置に、さらに液溜め 4 を設けたパターンを有するマイクロチップを用いる。

10 溝の深さはすべて 5 0  $\mu$ m、溝の幅及び長さは、溝 1 1 は幅 5 0  $\mu$ m 及び長さ 5 mm、溝 1 2 は幅 5 0  $\mu$ m 及び長さ 5 mm、溝 1 3 は幅 1 0 0  $\mu$ m 及び長さ 9 mm である。この平板状部材 3 1 の溝を有する面に、3 0 0  $\mu$ m 厚みのメタクリル樹脂シートを、メタアクリレートモノマーで溶解したアクリル系光硬化性接着剤により貼り合わせた。

15 そして、ディスポーザブルの注射針をその根本から 3 mm 程度の位置で切断し、先端部分を除去することにより、円錐形の外付け液溜めを作製した。この外付け液溜めの大きさは、内径 4 mm、高さ 1 0 mm であった。3 個の外付け液溜めを、液溜め 1 ~ 3 にそれぞれ連通するように、平板状部材 3 1 に接着しマイクロチップを完成した。

#### (送液系の構成)

20 マイクロシリンジ 4 1 , シリンジポンプ 4 0 , 及びシリンジポンプを改良したペリスタポンプ 5 0 から構成される送液系を第 1 3 図に示す。また、ペリスタポンプ 5 0 の構成を説明する概略図を第 1 4 図に示す。

25 シリンジポンプ 4 0 (ハーバード社製)に取り付けられたマイクロシリンジ 4 1 , 4 1 (ハミルトン社製、容量は 5 0 0  $\mu$ l)の先端と、ペリスタポンプ 5 0 に取り付けられたペリスタチューブ 5 1 , 5 1 (内径 2 5 0  $\mu$ m)の一端とが、エチレンビニルアセテートチューブ 4 2 , 4

2（内径350 $\mu$ m）により連結されている。そして、ペリスタチューブ51、51の他端とマイクロチップ60の液溜め1、2に連通する2つの外付け液溜め61、61とが、SUS製のチューブ52、52により連結されている。

- 5       ペリスタポンプ50においては、チューブストッパ55によりペリスタポンプ50に固定されたペリスタチューブ51が、ローラー53とアルミ平板54との間に挟まれている。そして、ローラー53がペリスタチューブ51の長手方向に移動することにより、ペリスタチューブ51内の液体がポリマーチップ60の方へ押し出されるようになっている。
- 10       このような構成により、ALP測定試薬及び検体が流量を制御されて、マイクロシリンジ41からマイクロチップ60に送液されるようになっている。

（光熱変換検出系の構成）

- 15       光熱変換検出系（光熱変換検出装置）としては、実施例1と同じ基本構成のものをを用いた。ただし、励起光用レーザーを、波長が633nmのHe-Neガスレーザーから635nmの発光をもつ半導体レーザー（三洋電機社製DL-4038-025）に変更した。そして、その変更に伴い光学系を調整した。

（測定試薬の調整）

- 20       実施例4と同様に調整した。ただし、BCIP濃度は15mMとした。

（検体：標準血清の調製）

- 25       検体には、調製法を一部改変したサイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）2500 $\mu$ lで溶解し、ALP活性が計算値で350IU/lになるように調製し、ストック溶液とした。次に、ストック溶液を精製水で希釈して、ALP活性が計算値で175IU/l及び100IU/lになるように調製した。

U/lである溶液を調製した。さらに、前記2つの溶液及び精製水各20  $\mu$ lに480  $\mu$ lの緩衝液1を混合し、これらを検体として用いた。各液には、流動を確認するための直径0.5  $\mu$ mのラテックスビーズ（大塚電子株式会社製、平板試料用セルモニター粒子）の懸濁液を、少量（0.1 vol %）添加した。

（ALP活性の検出）

シリンジ等を用いて手動により、液溜め1に測定試薬を、液溜め2に検体を注入した。両液を注入したマイクロチップ60を、37℃の空気恒温装置を取り付けた倒立顕微鏡のステージ上に設置した。

次に、マイクロチップ60の液溜め1及び液溜め2と、ペリスタポンプ50に取り付けられたペリスタチューブ51とを、SUSチューブで連結して、第13図に示すような構成の送液系を完成した。

シリンジポンプ41を駆動させることにより、測定試薬及び検体を600  $\mu$ l/hの流量で約3分間流して、マイクロチップ60のキャピラリー中に前記両液を送り込んだ。その後、シリンジポンプ41を停止して、実施例4と同様の方法によりALP活性の測定を行った。その結果、第15図に示すような検量線が得られた。

（実施例6）

（粒度分布測定）

ALP測定試薬と検体（生体成分由来試料）とを混合して得られた測定試料には、微細結晶が存在する場合がある。この微細結晶の粒度分布を測定したので、その結果について説明する。

BCIP濃度が70 mM及び6.25 mMのALP測定試薬25 mlと、ALP活性を計算値で800 IU/lに調製した標準血清（検体）とを、以下のように混合したもの（試料1～4）をそれぞれ用意した。

まず、試料1は、BCIP濃度が70 mMのALP測定試薬に、標準

血清 2 5 0 0  $\mu$ l を混合し、3 7 °C で 3 日間反応したものである。

次に、試料 2 は、B C I P 濃度が 7 0 mM の A L P 測定試薬に、標準血清 6 2 5  $\mu$ l を混合し、3 7 °C で 3 日間反応したものである。

さらに、試料 3 は、B C I P 濃度が 6 . 2 5 mM の A L P 測定試薬に、  
5 標準血清 6 2 5  $\mu$ l を混合し、3 7 °C で 3 時間反応したものである。

さらに、試料 4 は、B C I P 濃度が 6 . 2 5 mM の A L P 測定試薬そのものである（標準血清は混合せず）。

測定装置には、H O R I B A L A - 9 1 0 型レーザー回折／散乱式  
10 粒度分布測定装置を用いて、粒度分布測定を行った。具体的には、約 5  
0 m l の精製水が入った前記測定装置付随の超音波分散バスに 1 0 m l  
の試料 1 ~ 4 を添加し、測定を行った。粒度分布の測定条件である相対  
屈折率は、1 . 2 6 - 0 . 0 0 i とした。

測定の結果を第 1 6 図に示す。A L P 測定試薬と標準血清とを混合し  
反応して得られた測定試薬中には、前記反応の結果生成する B C I 2 が  
15 存在する。そして、その B C I 2 の粒子（微細結晶）は、おおよそ数百  
n m の粒径を有することが分かった。

また、粒度分布の測定結果より、数  $\mu$  m の大きさの粒子も存在するこ  
とが明らかになった。ただし、反応時間が長時間である試料、すなわち、  
反応時間が 3 日間である試料 1 , 2 の場合は、粒径が数百 n m の粒子が  
20 主に存在することから、数  $\mu$  m の大きさの粒子は B C I P であると考え  
られる。しかし、B C I P の粒子が、どのような状態で存在するのかは  
不明である。

よって、熱レンズ検出法に適した測定試薬としては、測定試薬と生体  
成分由来試料との反応生成物として色素粒子を生成しないことが必要で  
25 ある。また、A L P 測定試薬の B C I P 濃度や反応時間も適切なものと  
する必要がある。

なお、測定試薬と生体成分由来試料との反応以前に、BCI 2の粒子等の微細結晶が存在することが好ましくないことは言うまでもない。

(実施例 7)

本発明の一実施例として、血清中のLDH活性の定量測定を行った結果を示す。なお、該測定は、樹脂製のマイクロチップ内で、光熱変換検出法により行った。

(光熱変換検出系の構成)

光熱変換検出系（光熱変換検出装置）としては、実施例 1 と同じ基本構成のものを用いた。ただし、励起光用レーザーを、波長が633nmのHe-Neガスレーザーから635nmの発光を持つ半導体レーザー（三洋電機社製DL-4038-025）に変更した。そして、この変更に伴って、光学系を調整した。

(測定試薬の調整)

測定試薬キットであるLDHカイノス（カイノス社製）を利用して、測定試薬を作製した。

すなわち、LDHカイノスから発色色素であるNTBを除いたものに、2,2'-Dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-bisphenylen)ditetrazolium disodium salt（株式会社同仁化学研究所製、WST-5）を添加した。より具体的には、NTBを除いたLDHカイノス（基質緩衝液）16mlに、0.5mMのWST-5を溶解し、次に、反応試薬を溶解して測定試薬とした。

(検体：標準血清の調製)

検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）5mlで溶解し、LDH活性が計算値で700WUになる

ように調製し、ストック溶液とした。次に、ストック溶液を精製水で希釈して、計算値で400WU及び100WUのLDH活性を含む溶液を調製した。そして、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

(LDH活性の検出)

- 5 実施例5と同様の方法により、LDH活性の測定を行った。その結果、第17図に示すような検量線が得られた。

(実施例8)

(TPの測定)

- 10 測定試薬には、カイノスオートシリーズTP試薬(カイノス株式会社)を仕様書に従い用いた。

- 検体には、調製法を一部改変したサイトロールA(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水(共栄製薬株式会社)で溶解し、TP濃度が計算値で9.75g/dl、7.5g/dl、及び5.0g/dlとなるように調整した。そして、これら  
15 の溶液と精製水そのものを検体とした。

- 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、前記検体と前記測定試薬との混合、反応を、前記測定試薬の仕様書に従い行った。その後、測定試料を50μmの深さを有する平板ガラス製キューベット(GL Sciences社製Quartz Cell Type  
20 AB20-SQ-0.05)に移し、このキューベットを倒立顕微鏡のステージ上に設置した。対物レンズの焦点合わせは、ロックインアンプの出力値を見ながら、最高値を示す位置を指標にして行う。この最高値を前述のソフトウェアLabVIEWにより処理して、TP濃度の測定を行った。その結果、第18図に示すような検量線が得られた。

- 25 (実施例9)

(尿素窒素の測定)

測定試薬には、自動分析用試薬「生研」UN-I（デンカ生研株式会社）を仕様書に従い用いた。

5 検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、尿素窒素濃度が計算値で99.4mg/dℓ、24.9mg/dℓ、及び6.2mg/dℓとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

10 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして尿素窒素濃度の測定を行った。その結果、第19図に示すような検量線が得られた。

（実施例10）

（総ビリルビンの測定）

測定試薬には、総ビリルビン測定用HAテストワコー総ビリルビンI-I-HAテストワコー（和光純薬工業株式会社）を仕様書に従い用いた。

15 検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、総ビリルビン濃度が計算値で1.68mg/dℓ、0.4mg/dℓ、及び0.1mg/dℓとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

20 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして総ビリルビン濃度の測定を行った。その結果、第20図に示すような検量線が得られた。

（実施例11）

（γ-GTP活性の測定）

25 測定試薬には、γ-GTPカイノス（カイノス株式会社）を仕様書に従い用いた。



検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、 $\gamma$ -GTP活性が計算値で121 IU/ℓ、80 IU/ℓ、及び40 IU/ℓとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして $\gamma$ -GTP活性の測定を行った。その結果、第21図に示すような検量線が得られた。

（実施例12）

10 （アルブミンの測定）

測定試薬には、アルブミン試薬・A（国際試薬株式会社）を仕様書に従い用いた。

検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、アルブミン濃度が計算値で7.0 g/dℓ、4.71 g/dℓ、及び2.35 g/dℓとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にしてアルブミン濃度の測定を行った。その結果、第22図に示すような検量線が得られた。

以下の参考例2～9に、種々の物質の測定例を参考として示す。

（参考例2）

（AST活性の測定）

測定試薬には、TALNカイノス（カイノス株式会社）を仕様書に従い用いた。ただし、この測定試薬は、TALNカイノスに通常含まれるTOOSの代わりにDAOS（株式会社同仁化学研究所）を含有し

ている。その濃度は、通常T O O Sが含まれている濃度と同一である。

検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、A S T活性が計算値で2 3 8 K U、3 3 . 6 K U、及び1 . 7 K Uとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例4と同様にしてA S T活性の測定を行った。その結果、第2 3 図に示すような検量線が得られた。

10      (参考例3)

          (尿酸の測定)

測定試薬には、イアトロL Q   U A（ヤترون株式会社）を仕様書に従い用いた。

検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会社）を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水（共栄製薬株式会社）で溶解し、尿酸濃度が計算値で9 . 7 9 m g / d l、6 . 5 3 m g / d l、及び3 . 2 5 m g / d lとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして尿酸濃度の測定を行った。その結果、第2 4 図に示すような検量線が得られた。

          (参考例4)

          (グルコースの測定)

測定試薬には、デタミナーG L ・ E（協和メデックス株式会社）を仕様書に従い用いた。

検体には、調製法を一部改変したスイトロールA（日水製薬株式会

社)を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水(共栄製薬株式会社)で溶解し、グルコース濃度が計算値で $305\text{ mg/dl}$ 、 $101.7\text{ mg/dl}$ 、及び $50.9\text{ mg/dl}$ となるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

- 5 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にしてグルコース濃度の測定を行った。その結果、第25図に示すような検量線が得られた。

(参考例5)

(総コレステロールの測定)

- 10 測定試薬には、総コレステロール測定用HAテストワコーコレステロールE-HAテストワコー(和光純薬工業株式会社)を仕様書に従い用いた。

- 15 検体には、調製法を一部改変したサイトロールA(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水(共栄製薬株式会社)で溶解し、総コレステロール濃度が計算値で $800\text{ mg/dl}$ 、 $400\text{ mg/dl}$ 、及び $200\text{ mg/dl}$ となるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

- 20 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして総コレステロール濃度の測定を行った。その結果、第26図に示すような検量線が得られた。

(参考例6)

(HDL-コレステロールの測定)

- 25 測定試薬にはコレステストHDL(第一化学薬品株式会社)を仕様書に従い用いた。

- 25 検体には、調製法を一部改変したサイトロールA(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、1バイヤルの凍結乾燥品を精製水(共栄製

薬株式会社)で溶解し、HDL-コレステロール濃度が計算値で76.8 mg/dl、48 mg/dl、及び24 mg/dlとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。

- 5 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にしてHDL-コレステロール濃度の測定を行った。その結果、第27図に示すような検量線が得られた。

(参考例7)

(LDL-コレステロールの測定)

- 10 測定試薬には、コレステストLDL(第一化学薬品株式会社)を仕様書に従い用いた。

- 検体には、調製法を一部改変したサイトロールA(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水(共栄製薬株式会社)で溶解し、LDL-コレステロール濃度が計算値で270 mg/dl、135 mg/dl、及び62.5 mg/dlとなるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものとを検体とした。
- 15

光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にしてLDL-コレステロール濃度の測定を行った。その結果、第28図に示すような検量線が得られた。

(参考例8)

- 20 (中性脂肪の測定)

測定試薬には、自動分析装置用試薬-HRトリグリセライド-HR(和光純薬工業株式会社)を仕様書に従い用いた。

- 検体には、調製法を一部改変したサイトロールA(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を精製水(共栄製薬株式会社)で溶解し、中性脂肪濃度が計算値で208 mg/dl、104 mg/dl、及び34.7 mg/dlとなるように調整した。そして、
- 25

て、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

光熱変換検出装置は、実施例 4 と同様の構成の物を用いた。そして、実施例 8 と同様にして中性脂肪濃度の測定を行った。その結果、第 29 図に示すような検量線が得られた。

5 (参考例 9)

(クレアチニンの測定)

測定試薬には、クレアチニン測定用 L タイプクレアチニン F (和光純薬工業株式会社) を仕様書に従い用いた。

10 検体には、調製法を一部改変したスイトロール A (日水製薬株式会社) を用いた。具体的には、1 バイヤルの凍結乾燥品を精製水 (共栄製薬株式会社) で溶解し、クレアチニン濃度が計算値で  $1.58 \text{ mg/dl}$ 、 $0.79 \text{ mg/dl}$ 、及び  $0.39 \text{ mg/dl}$  となるように調整した。そして、これらの溶液と精製水そのものを検体とした。

15 光熱変換検出装置は、実施例 4 と同様の構成の物を用いた。そして、実施例 8 と同様にしてクレアチニン濃度の測定を行った。その結果、第 30 図に示すような検量線が得られた。

次に、乳びを呈する血液試料の測定結果について説明する。

(実施例 13)

20 測定試薬には、HA テストワコーコレステロール E - HA テストワコー (和光純薬工業株式会社) を仕様書に従い用いた。

検体には、調製法を一部改変したスイトロール A (日水製薬株式会社) を用いた。具体的には、1 バイヤルの凍結乾燥品を精製水 (共栄製薬株式会社) で溶解し、総コレステロールが計算値で  $800 \text{ mg/dl}$ 、 $400 \text{ mg/dl}$ 、 $200 \text{ mg/dl}$ 、及び  $0 \text{ mg/dl}$  (精製水そのもの) となるように調整した。そして、これらの溶液を、干渉チェック・A プラス (国際試薬株式会社) の乳び及び乳びブランクで、 $1/10$

に希釈したものを検体とした。なお、干渉チェック・Aプラスの乳びで希釈したものが乳びを呈する検体であり、干渉チェック・Aプラスの乳びブランクで希釈したものが乳びを呈さない検体である。

希釈後の乳びを呈する検体のホルマジン度は、2100度であった。

- 5 光熱変換検出装置は、実施例4と同様の構成の物を用いた。そして、実施例8と同様にして総コレステロール濃度の測定を行った。その結果、第31図に示すような検量線が得られた。第31図のグラフから分かるように、乳びを呈する検体の検量線と乳びを呈さない検体の検量線とは、ほぼ一致している。この結果から光熱変換検出法においては、乳びの影響がほとんどないことが分かる。
- 10

次に、同様にして調製した測定試料について、吸光度計（島津UV2200）により、波長635nmにおける吸光度の測定を行った。その結果を第32図に示す。

- この結果から、乳びを呈する検体は、乳びを呈さない検体と比較して、
- 15 吸光度が約0.2程度高い値を示すことが分かった。このことから、吸光度測定においては、バックグラウンドを差し引くために、異なる2つの波長において測定を行うことが必要であることが分かる。

#### 産業上の利用可能性

- 20 以上のように、本発明の物質の測定方法によれば、極微量の生体成分由来試料中のヘモグロビン、ALP等の物質の量を、光熱変換検出法により簡便且つ短時間に測定することができる。さらに、本発明の物質の測定方法によれば、キャピラリ中に沈殿や反応生成物の微結晶が生じることなく、光熱変換検出法により安定した測定が可能である。特に、励起光として長波長のレーザーを用いるので光熱変換検出装置を安価に製造でき、測定を低コストで行うことができる。
- 25

また、本発明の物質の測定方法は、試料調製工程と光熱変換検出工程とをマイクロチップ内において行うので、測定に要する生体成分由来試料及び測定試薬が微量である。さらに、生体成分由来試料と測定試薬とを混合して測定試料を調製する操作が簡便であり、また、廃棄物も少なくなる。

特に、本発明のヘモグロビンの測定方法によれば、ヘモグロビンの安定な測定が可能である。そして、測定試薬に毒物であるシアニドを含有しないので、測定試薬の取扱いに危険を伴うことがなく、また、煩雑な廃液処理も不要である。

10 さらに、本発明の物質の測定方法によれば、臨床検査上問題になる乳びを呈する血液試料であっても、異なる2つの波長において測定を行う必要がなく、1回の測定で定量的な測定が可能である。

また、本発明の測定試薬を用いれば、極微量の生体成分由来試料中のヘモグロビン、ALP等の物質の量を、光熱変換検出法により安定して  
15 測定することが可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. 生体成分由来試料中の物質を検出又はその濃度の測定を行う方法であって、
- 5 試料調製工程と光熱変換検出工程とを備えていて、  
前記試料調製工程は、前記生体成分由来試料と測定試薬とを混合し反応させ、過酸化水素を誘導することなく、前記物質とは吸収波長が異なる反応生成物を前記物質の量に対応する量だけ生成させて、測定試料を調製する工程であり、
- 10 前記光熱変換検出工程は、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する工程であるとともに、  
前記反応生成物は水溶性を有し、且つ、前記励起光の波長領域における前記反応生成物の吸光度は、前記温度変化を生じさせるに足るものであることを特徴とする物質の測定方法。
- 15 2. 前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出工程では、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することを特徴とする請求の範囲第1項記載の物質の測定方法。
- 20 3. 前記励起光の波長が600nm以上であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項記載の物質の測定方法。
4. 前記生体成分由来試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことを特徴とする請求の範囲
- 25 第1項～第3項のいずれかに記載の物質の測定方法。
5. 前記キャピラリは一对の平板状部材を張り合わせるにより形



成されるものであって、前記一对の平板状部材のうち少なくとも一方がその板面に溝を備えていて、前記一对の平板状部材は前記溝を備えた板面を内側にして張り合わされていることを特徴とする請求の範囲第4項記載の物質の測定方法。

- 5      6.    前記生体成分由来試料が血液試料であり、前記物質がヘモグロビンであって、前記試料調製工程は、前記血液試料と前記測定試薬とを混合し溶血させて前記測定試料を調製することを特徴とする請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の物質の測定方法。

- 10     7.    前記励起光の波長が610nmから650nmの範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする請求の範囲第6項記載の物質の測定方法。

8.    前記励起光の波長が620nmから640nmの範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする請求の範囲第6項記載の物質の測定方法。

- 15     9.    前記測定試薬が、赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、pHを5から7の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むことを特徴とする請求の範囲第6項～第8項のいずれかに記載の物質の測定方法。

- 20     10.   前記測定試薬がシアニドを含有しないことを特徴とする請求の範囲第9項記載の物質の測定方法。

11.   前記血液試料と前記測定試薬との混合比が、1:1から1:250の範囲であることを特徴とする請求の範囲第6項～第10項のいずれかに記載の物質の測定方法。

- 25     12.   前記物質がフォスファターゼであり、前記測定試薬は前記フォスファターゼに対する基質を含有するとともに、前記試料調製工程は、前記生体成分由来試料と前記測定試薬とを混合し、前記生体成分由来試

料中のフォスファターゼと前記測定試薬中の前記基質とを反応させて測定試料を調製することを特徴とする請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の物質の測定方法。

5 13. 前記基質がリン酸エステル結合を有することを特徴とする請求の範囲第12項記載の物質の測定方法。

14. 前記基質が、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェート及びその塩のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第12項又は第13項記載の物質の測定方法。

10 15. 前記フォスファターゼがアルカリフォスファターゼであることを特徴とする請求の範囲第12項～第14項のいずれかに記載の物質の測定法。

16. 前記測定試料中の前記基質の濃度が、1～15 mMの範囲であることを特徴とする請求の範囲第12項～第15項のいずれかに記載の物質の測定方法。

15 17. 前記生体成分由来試料と前記測定試薬とを混合してから、前記物理量変化を測定するまでの時間が、3～15分であることを特徴とする請求の範囲第12項～第16項のいずれかに記載の物質の測定方法。

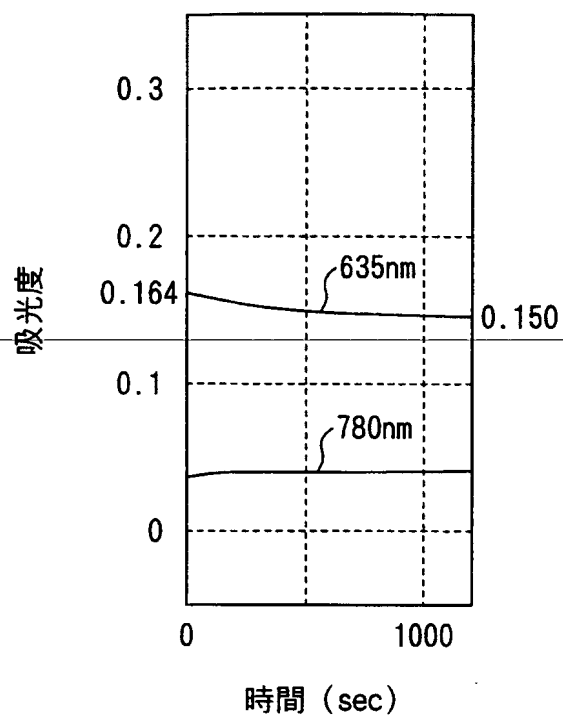
20 18. 乳びを呈する血液試料中の物質を検出又はその濃度の測定を行う方法であって、前記血液試料と測定試薬とを混合して測定試料を調製する試料調製工程と、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換検出工程と、を備えることを特徴とする物質の測定方法。

25 19. 前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出工程では、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することを特徴とする請求の範囲第18項記載の物質の測定方法。

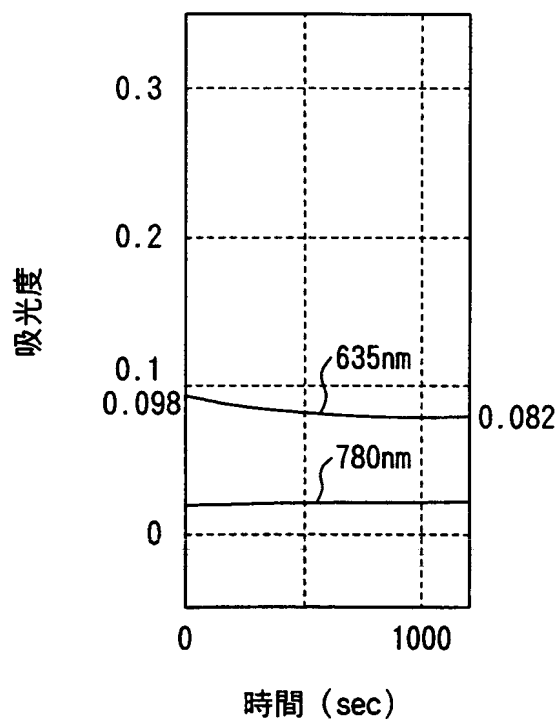
20. 前記血液試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことを特徴とする請求の範囲第18項又は第19項記載の物質の測定方法。
- 5 21. 前記キャピラリは一对の平板状部材を張り合わせるにより形成されるものであって、前記一对の平板状部材のうち少なくとも一方がその板面に溝を備えていて、前記一对の平板状部材は前記溝を備えた板面を内側にして張り合わされていることを特徴とする請求の範囲第20項記載の物質の測定方法。
- 10 22. 請求の範囲第6項～第11項の物質の測定方法において用いる測定試薬であって、  
赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、pHを5から7の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むことを特徴とする測定試薬。
- 15 23. 請求の範囲第12項～第17項の物質の測定方法において用いる測定試薬であって、リン酸エステル結合を有する基質を備えることを特徴とする測定試薬。  
24. 前記基質が、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェート及びその塩のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第20 23項記載の測定試薬。



第 1 図

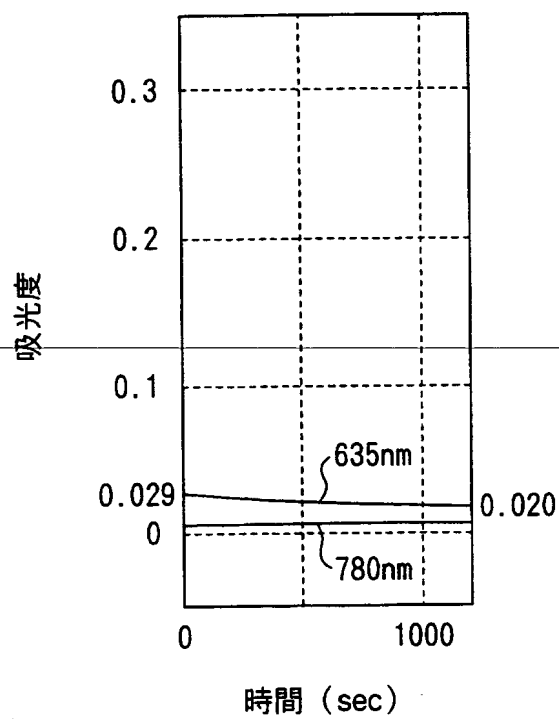


第 2 図

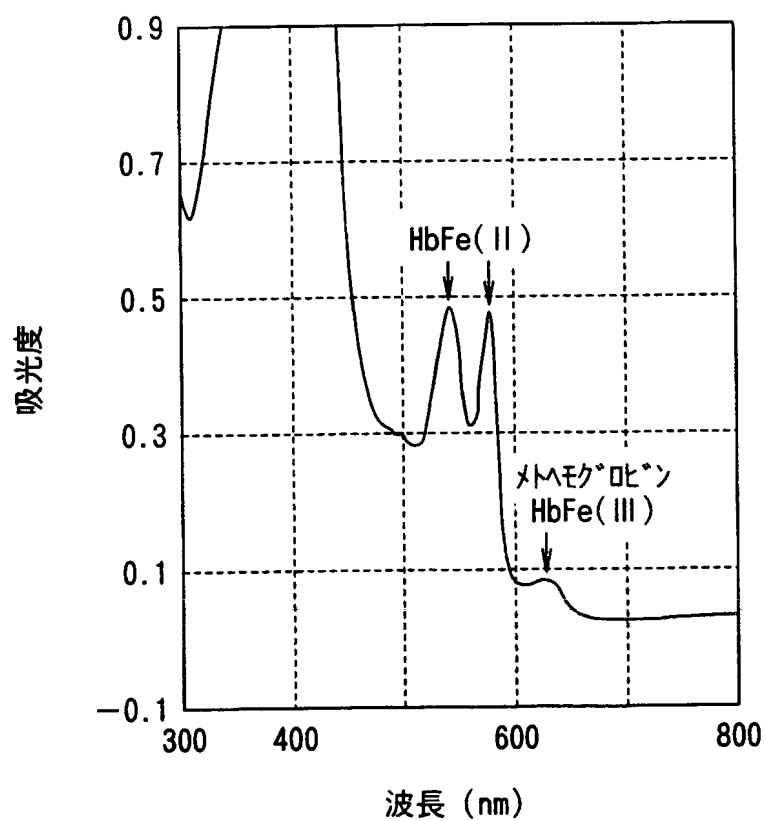




第3図



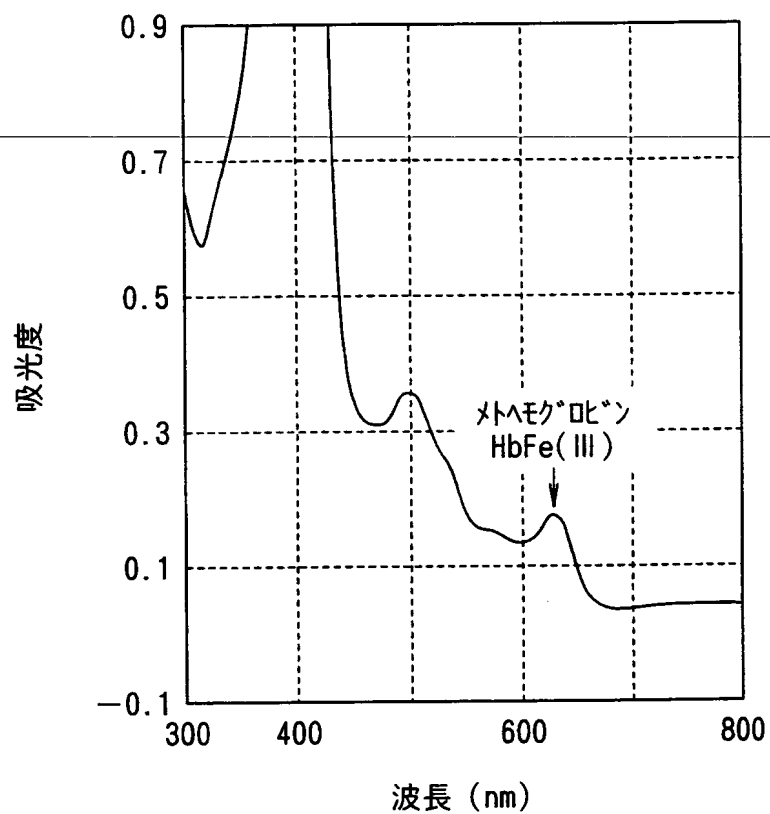
第4図





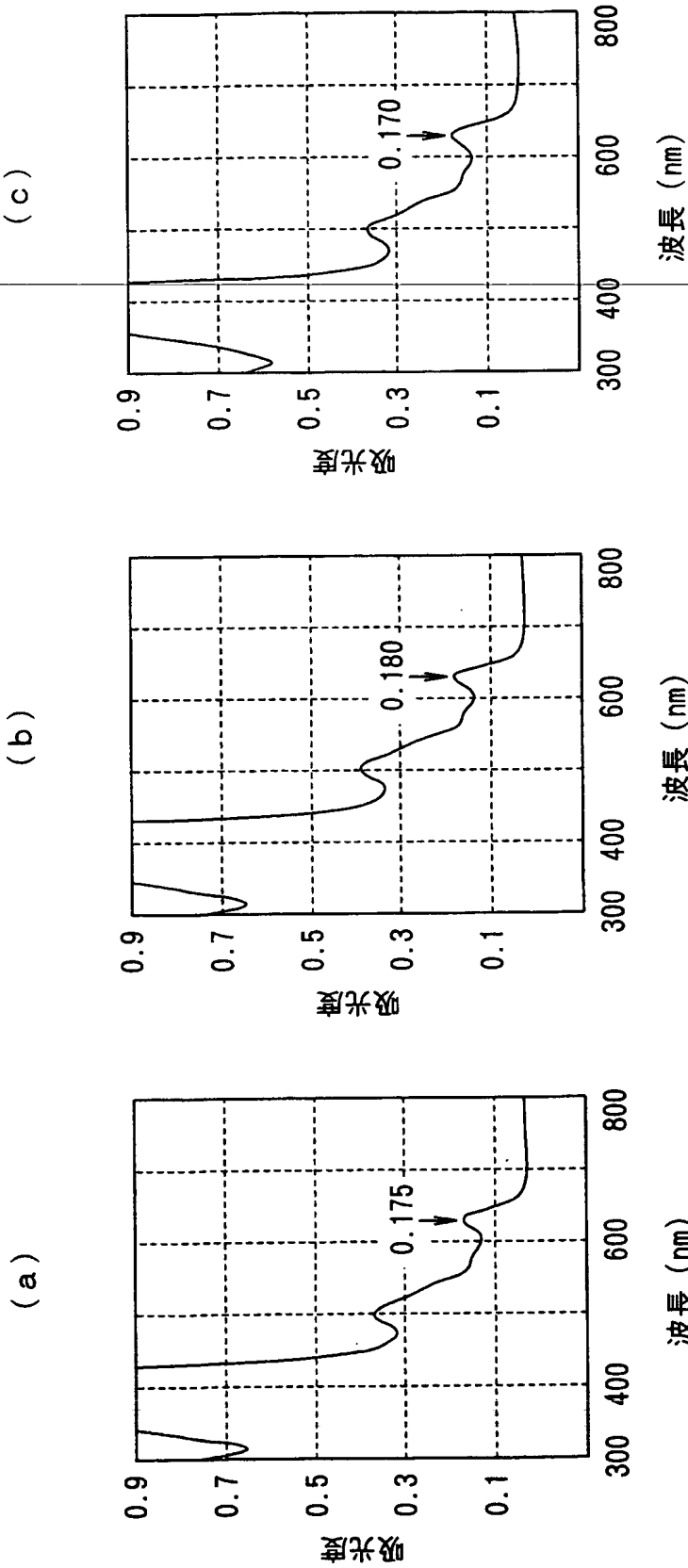


## 第5図



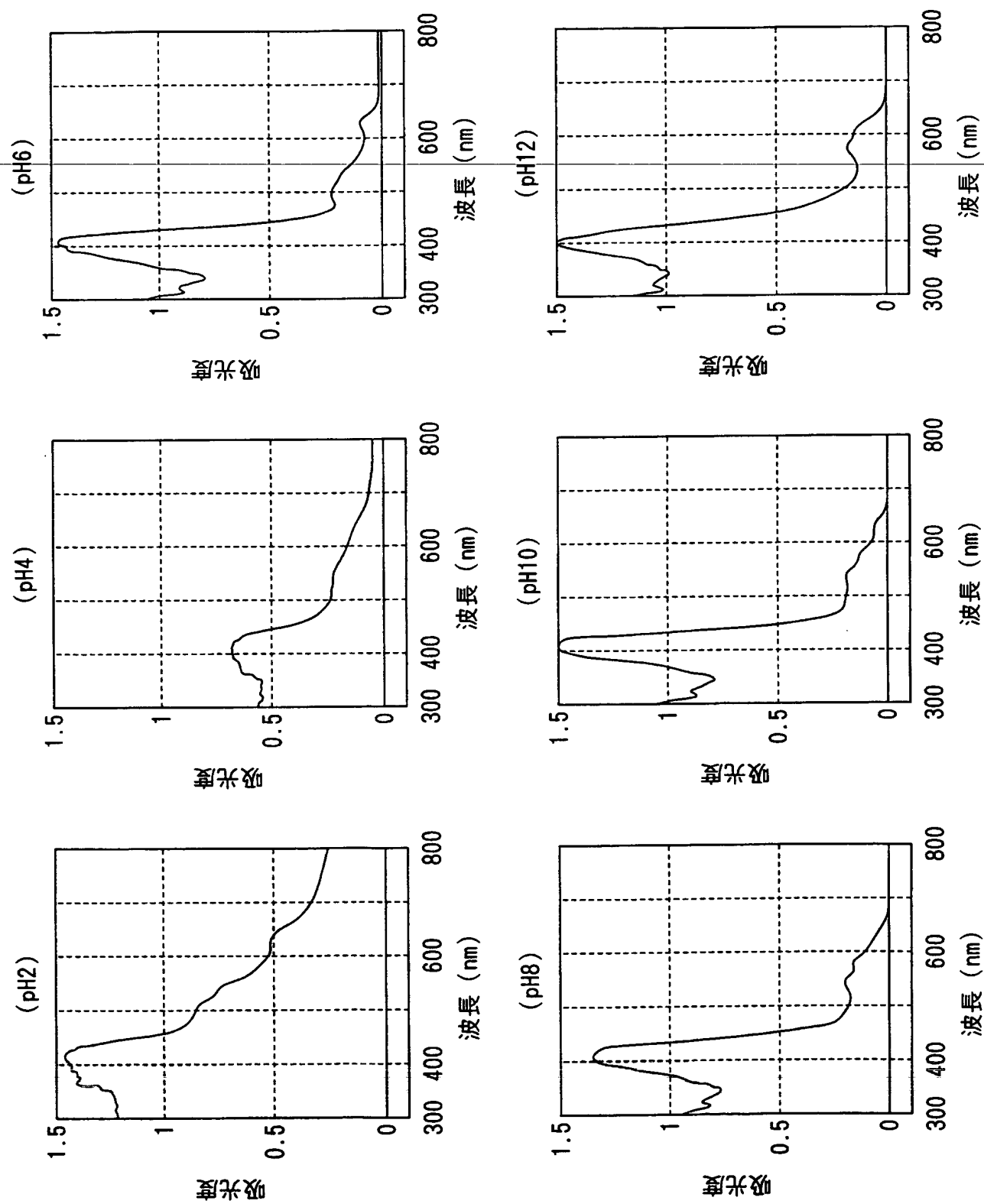


第6図



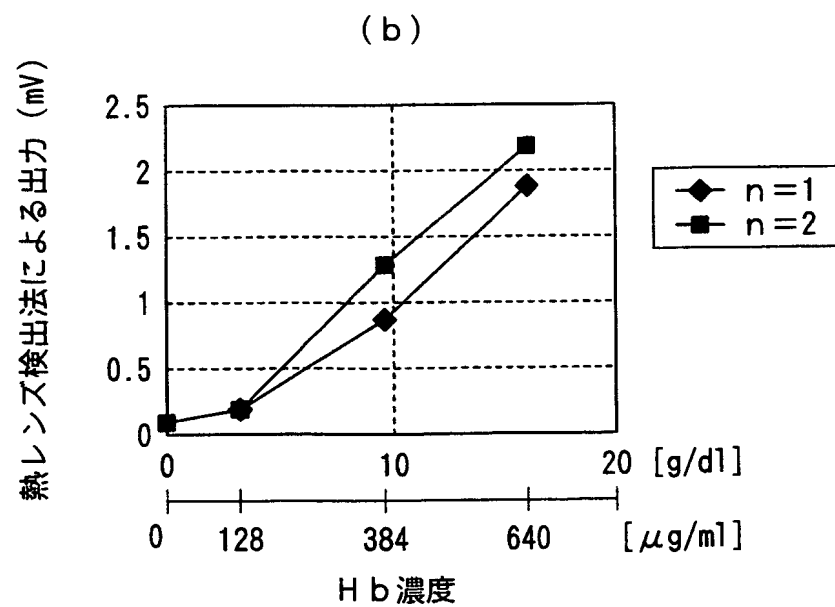
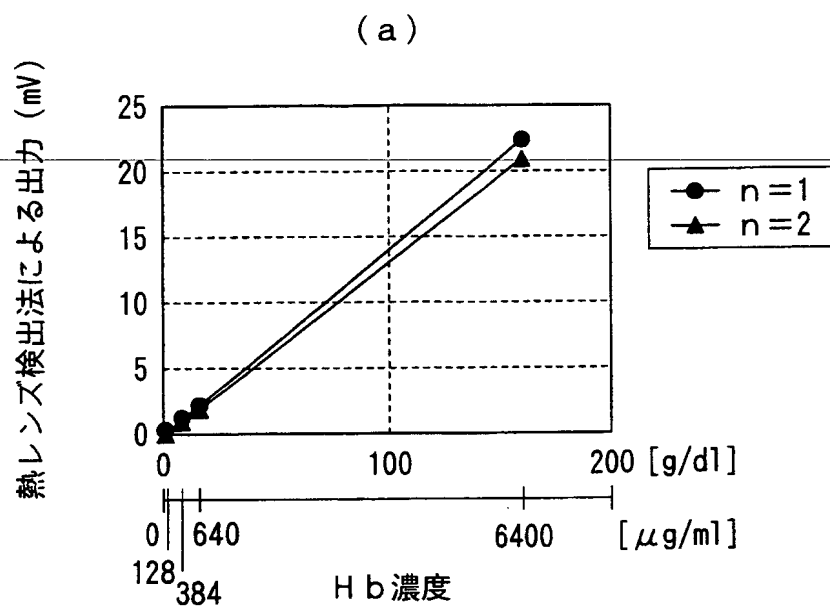


第7図





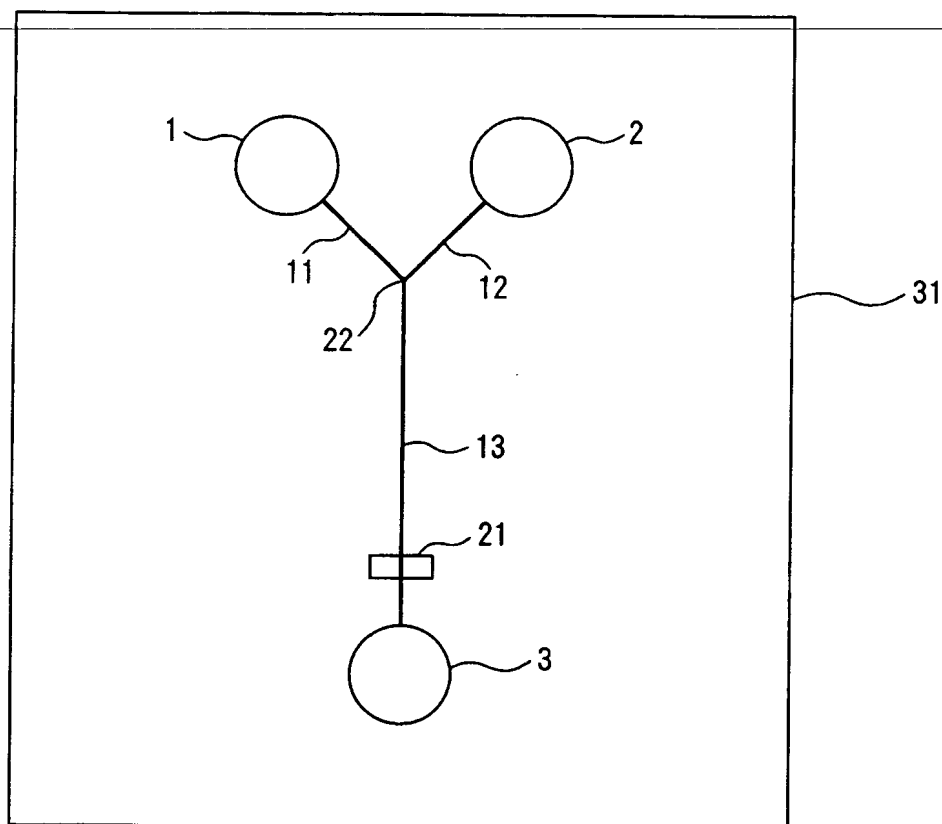
## 第8図





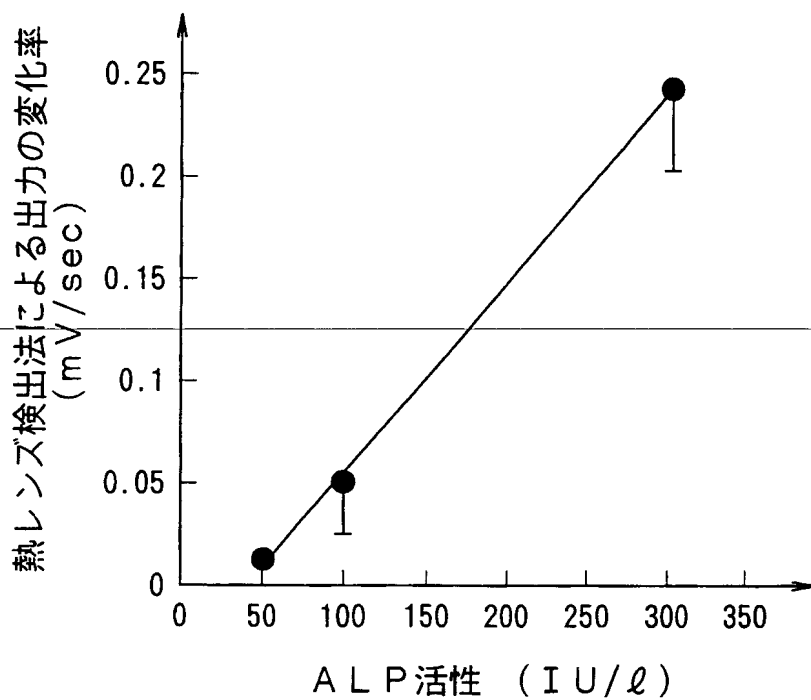


第 9 図

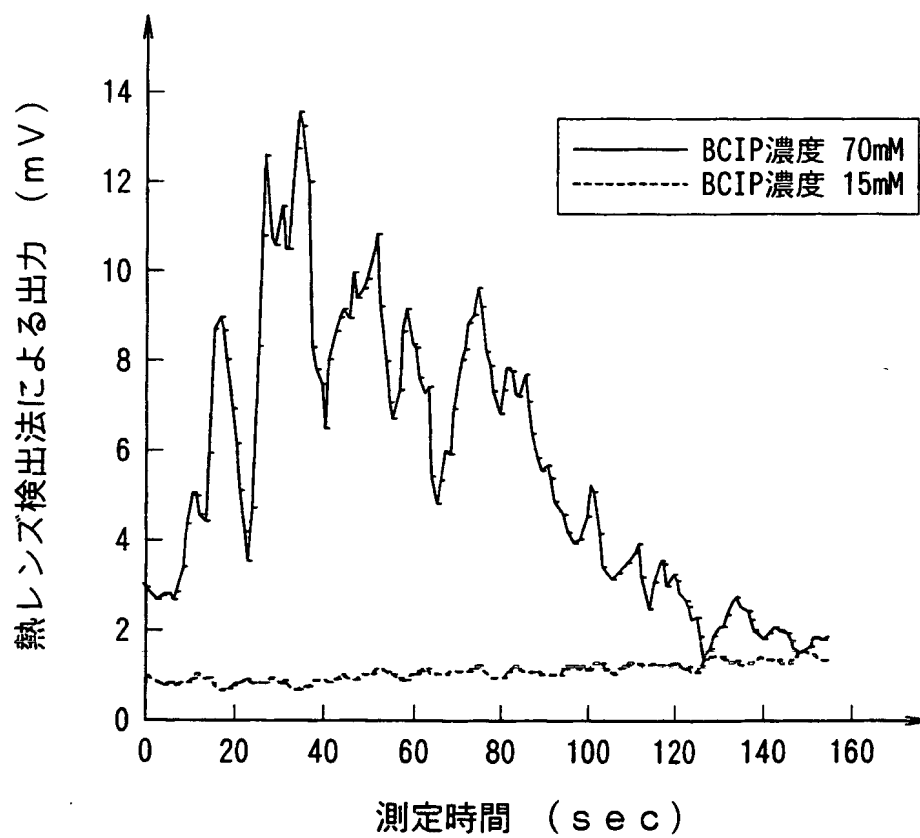




第10図

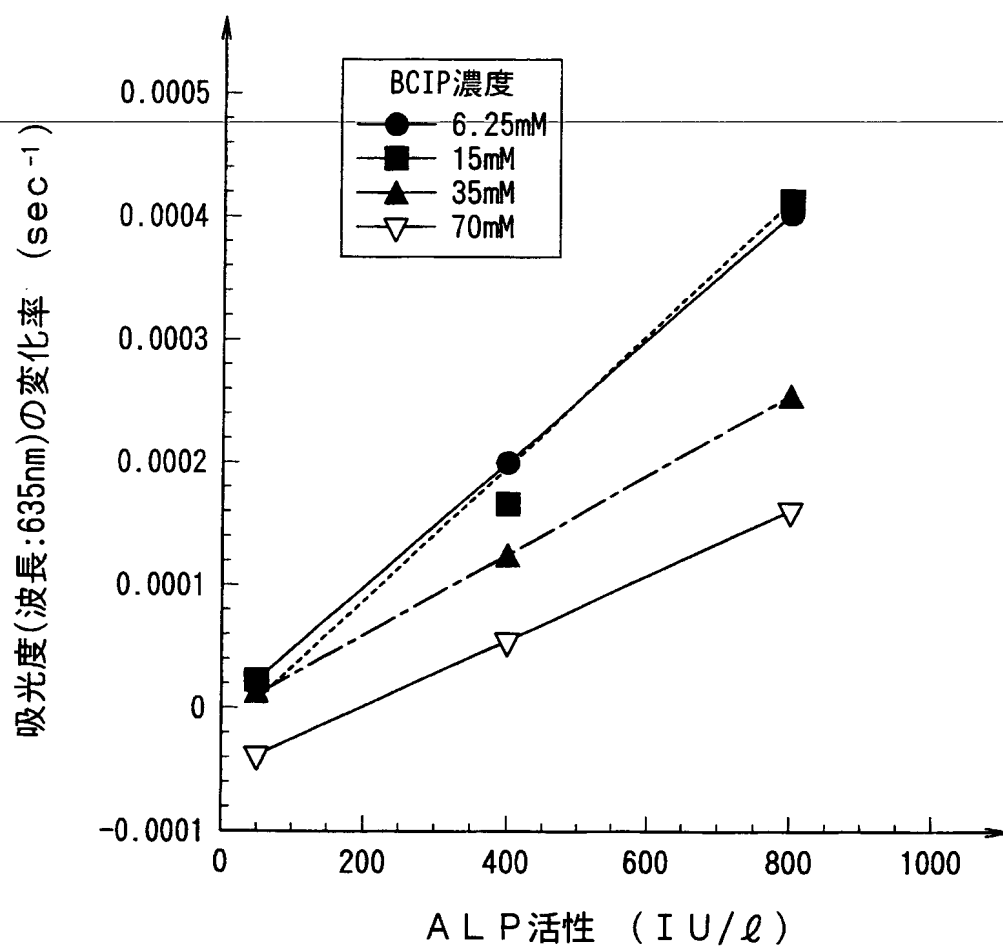


第11図



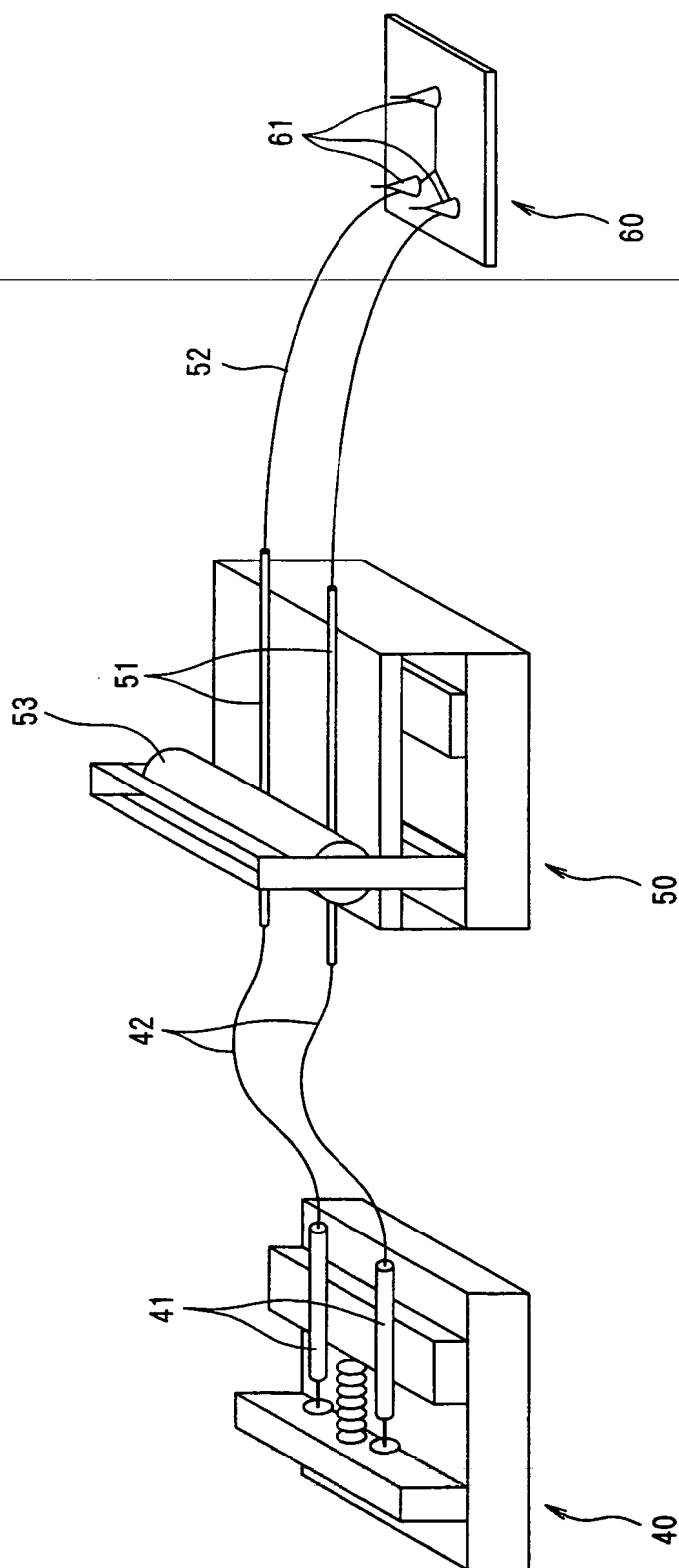


第12図





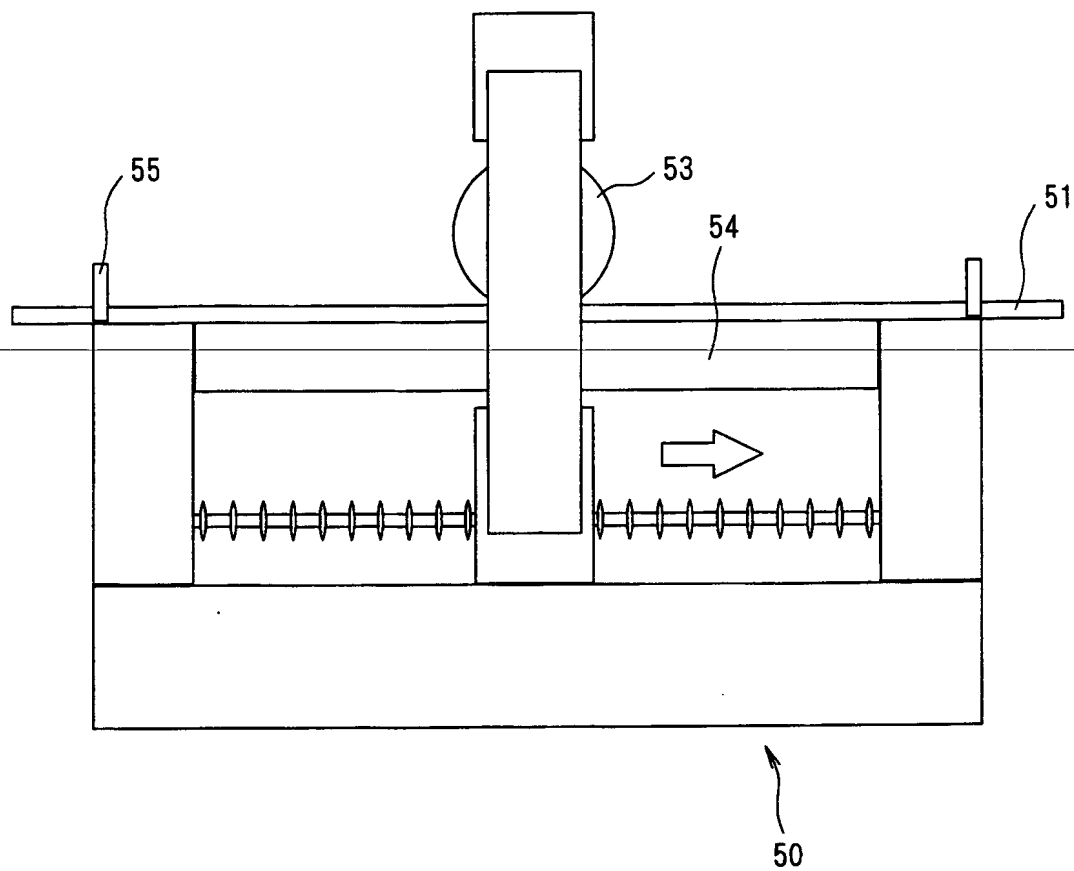
第13図



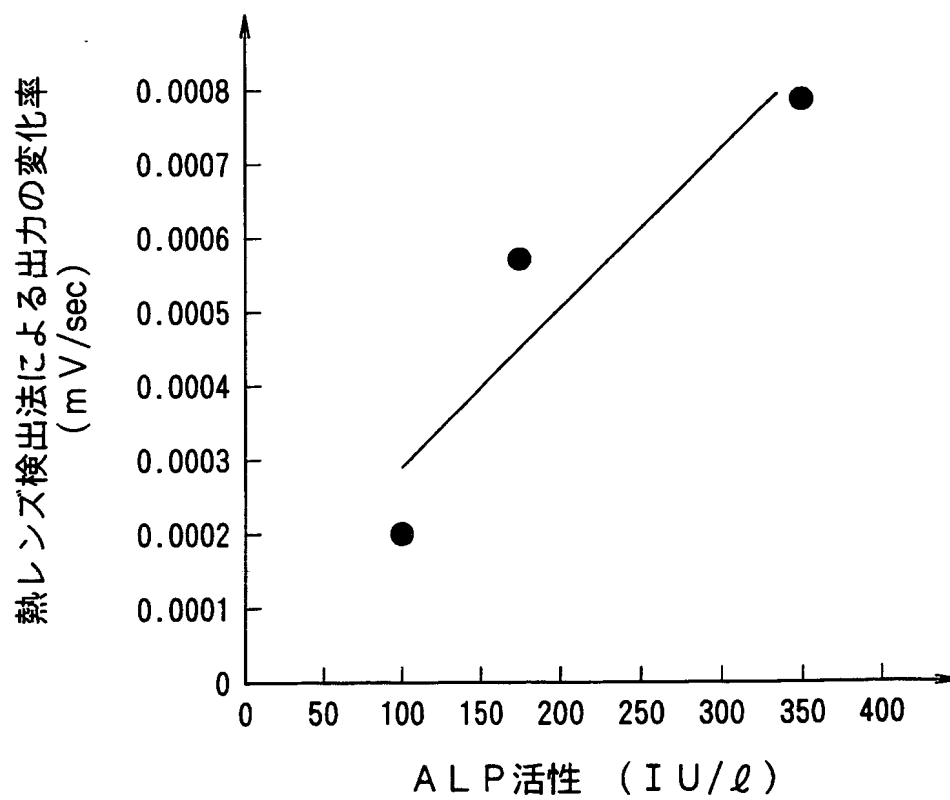




第14図

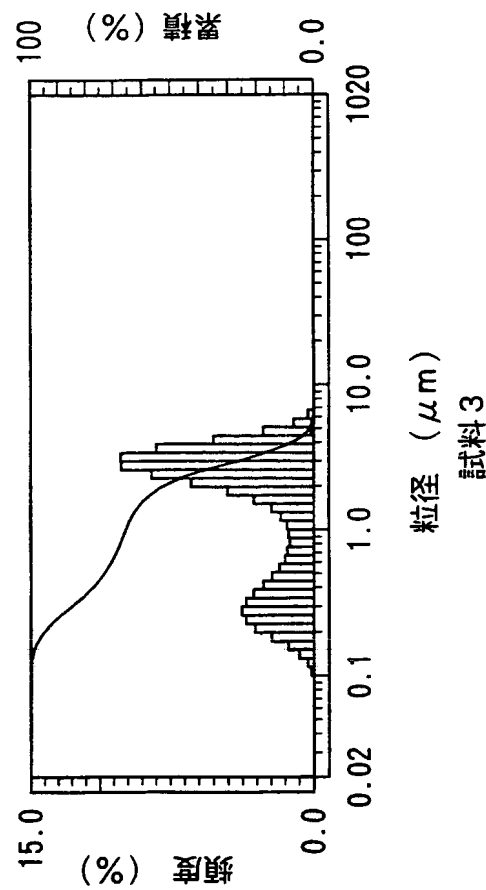
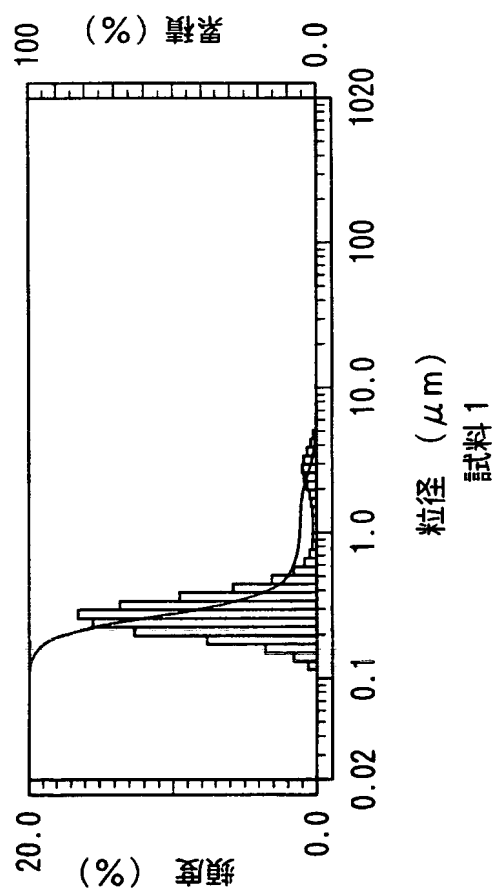
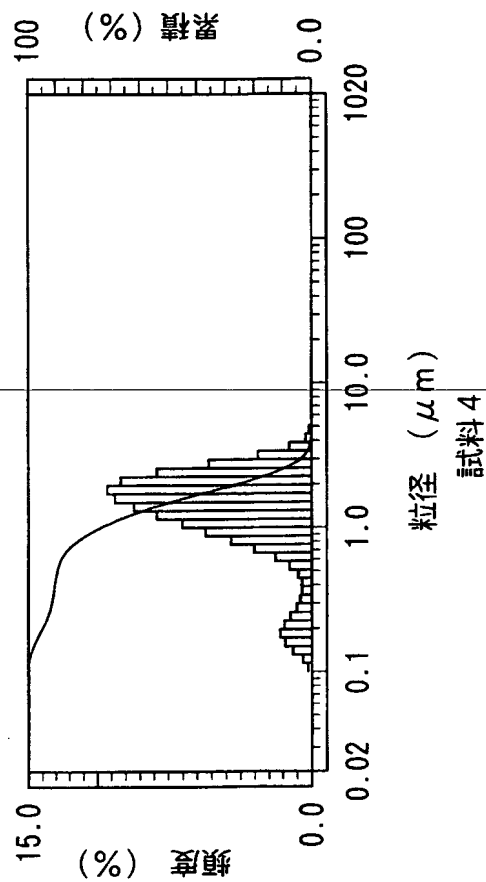
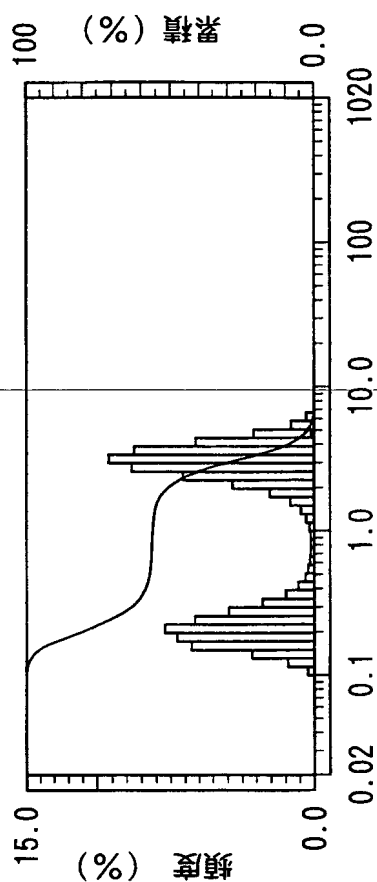


第15図



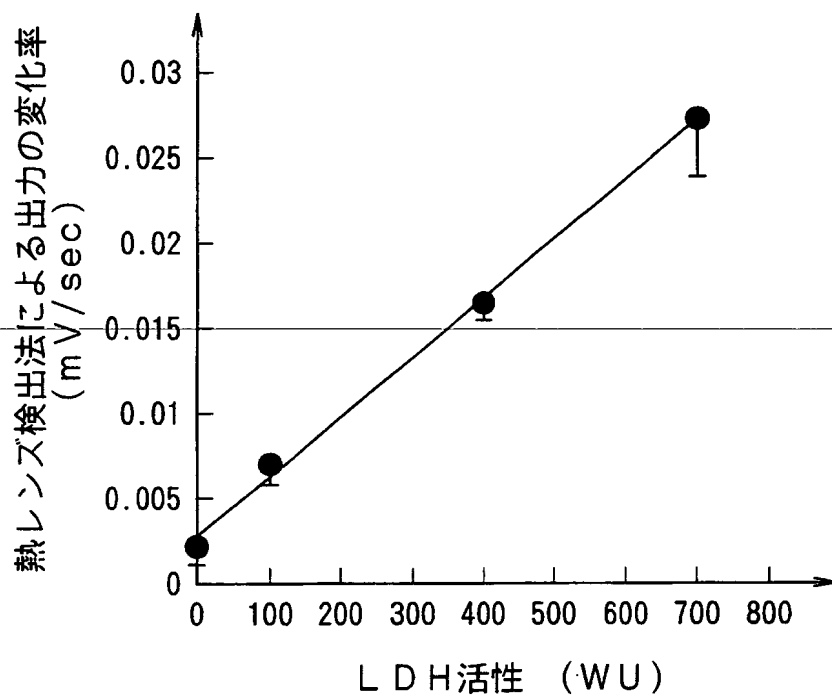


第16図

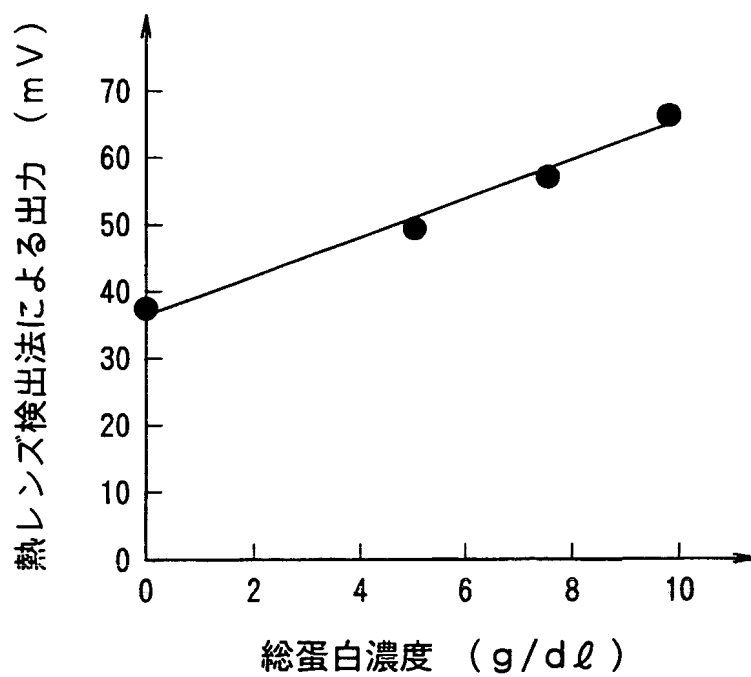




第17図

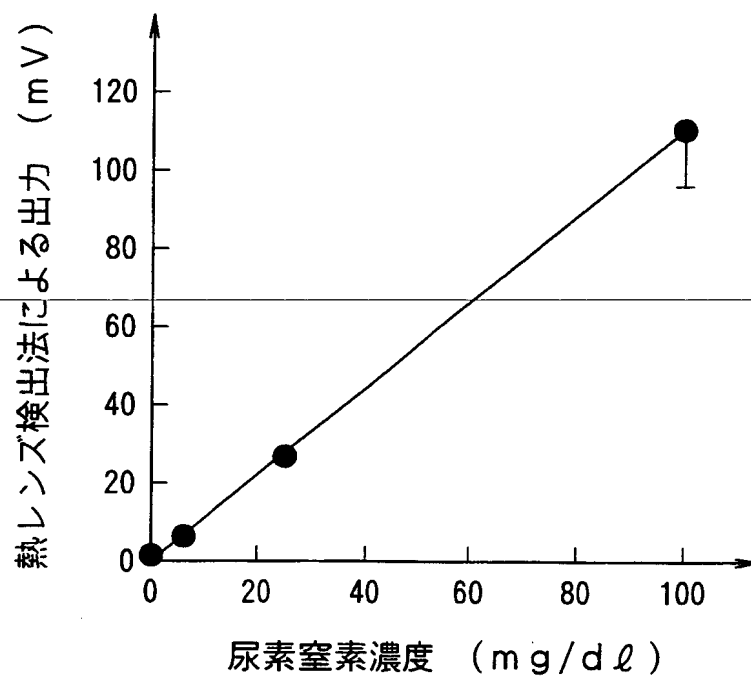


第18図

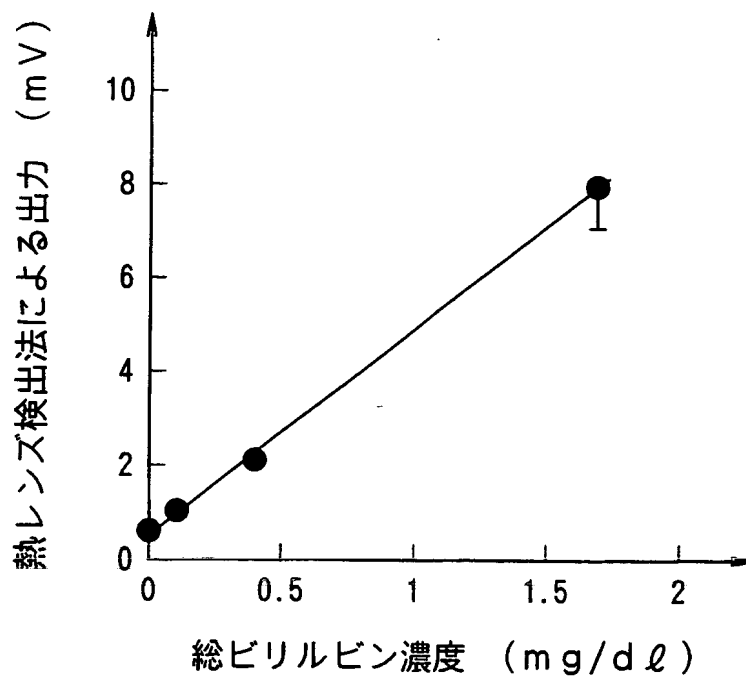




第19図



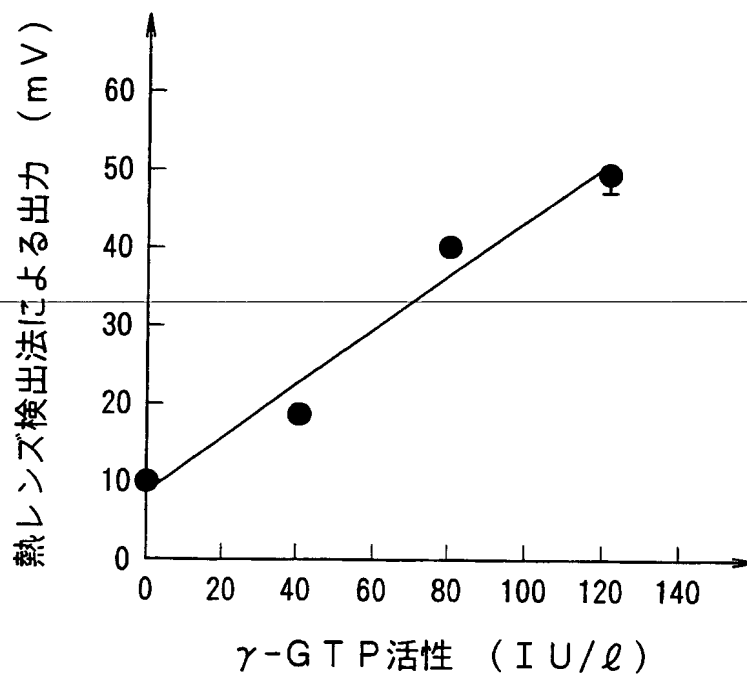
第20図



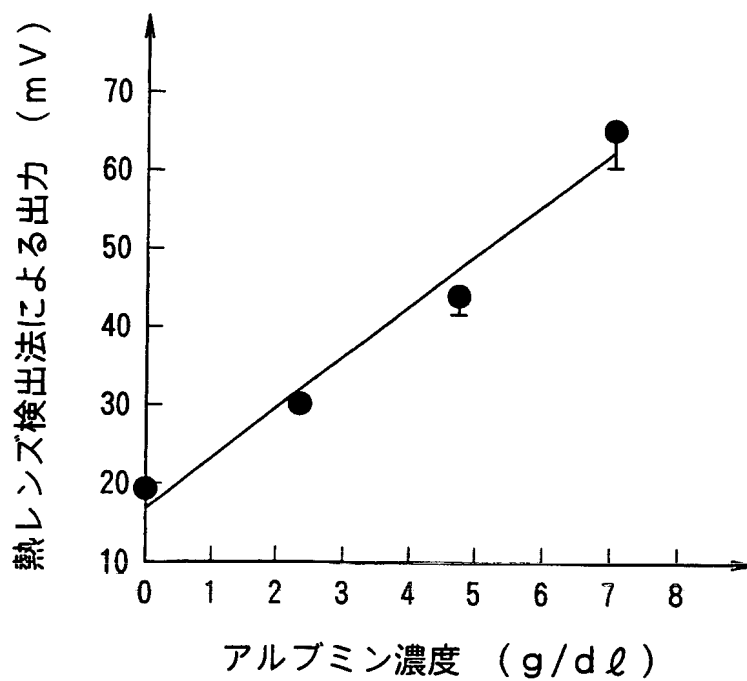




第21図

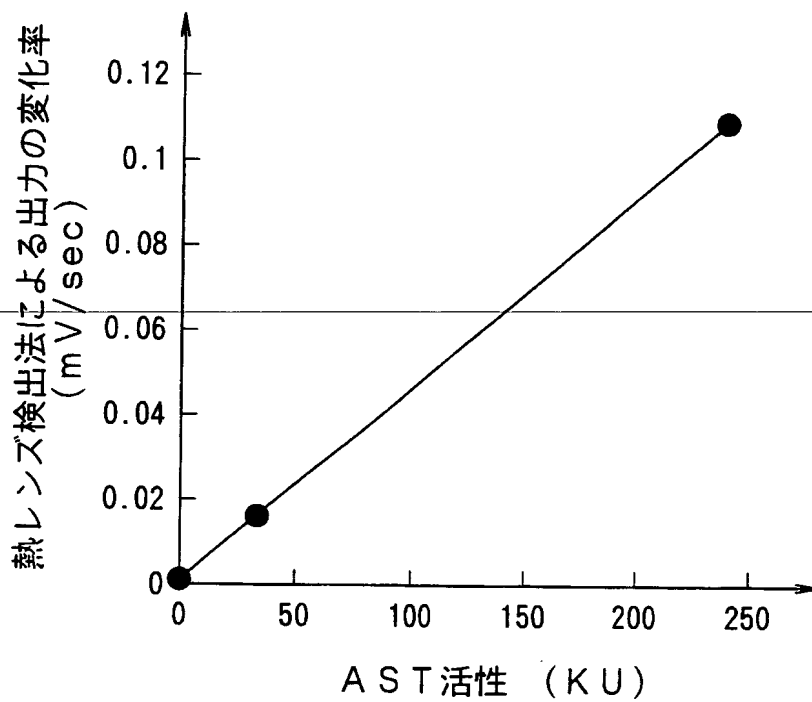


第22図

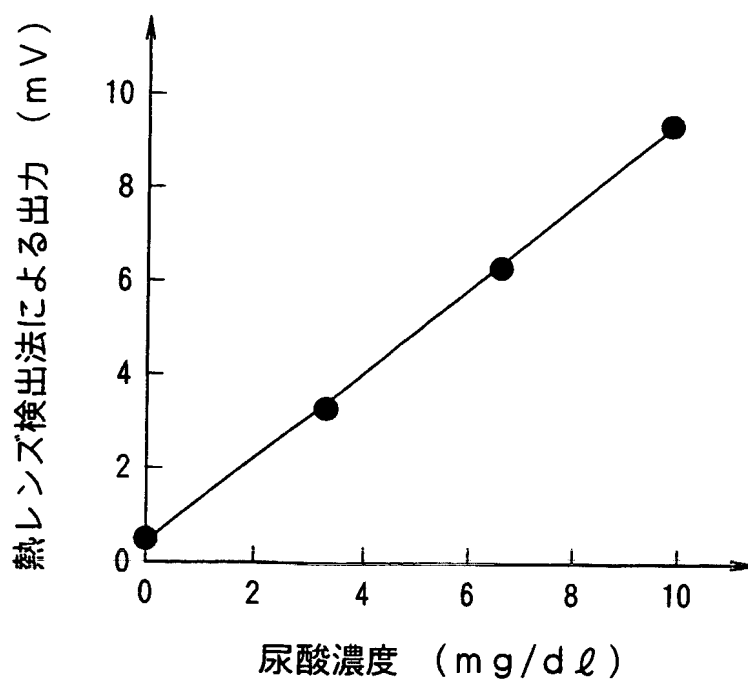




第23図

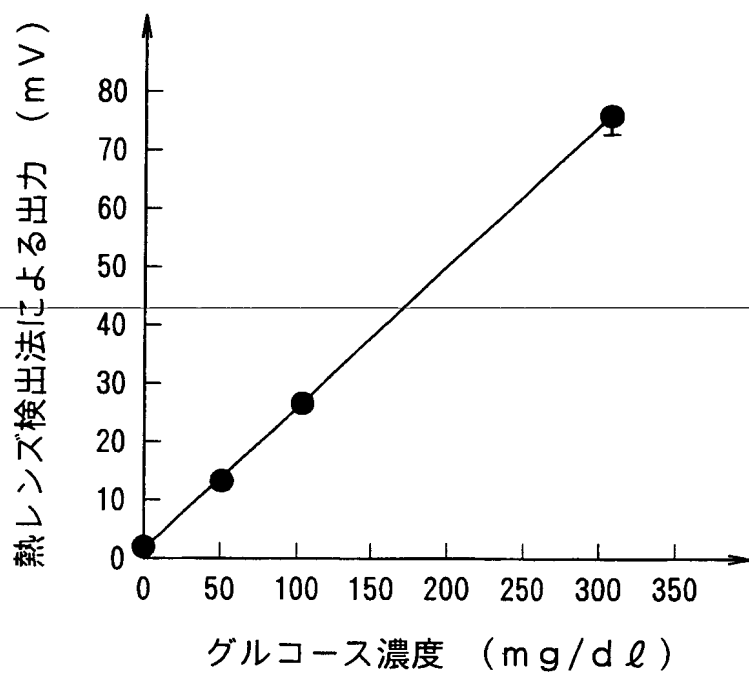


第24図

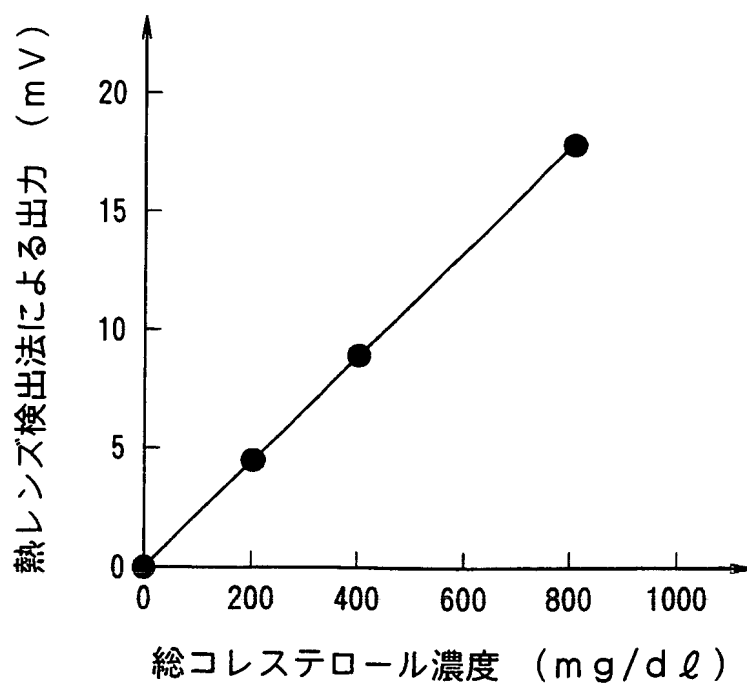




第25図

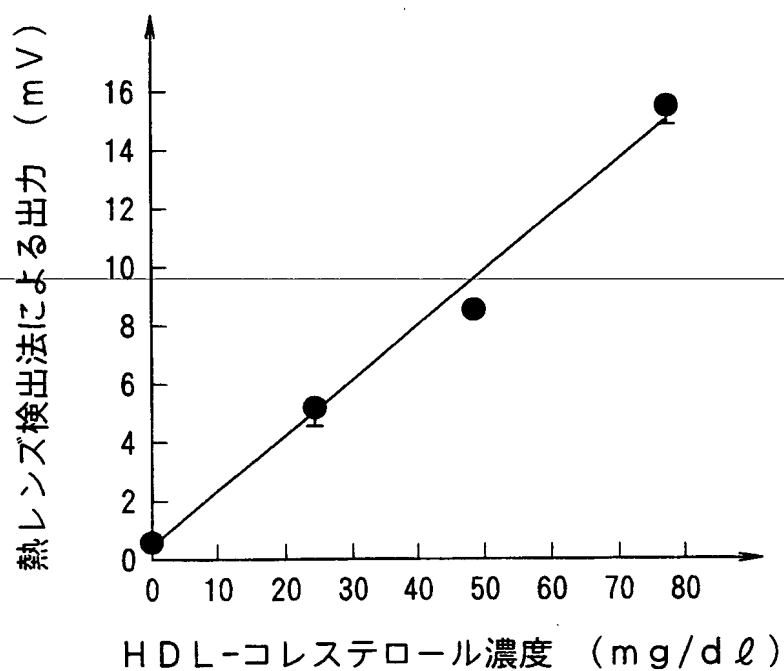


第26図

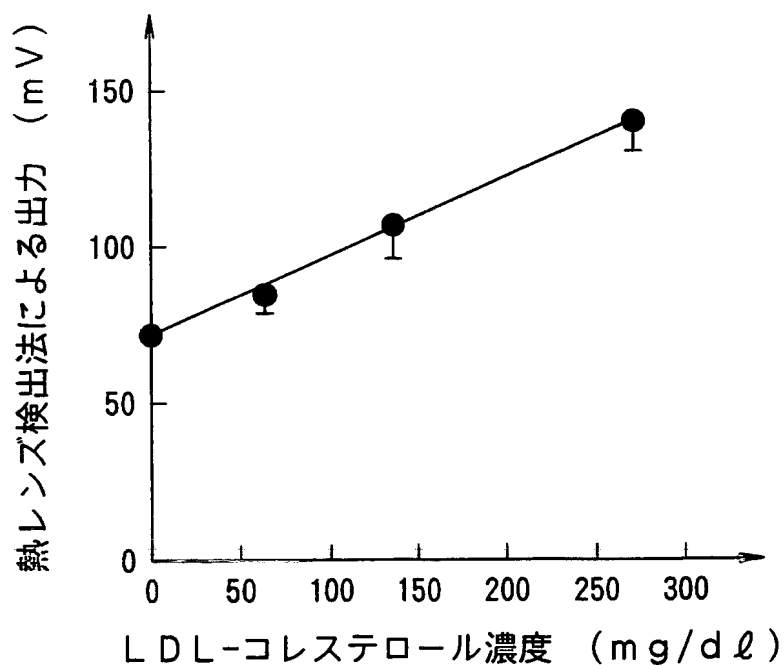




第27図



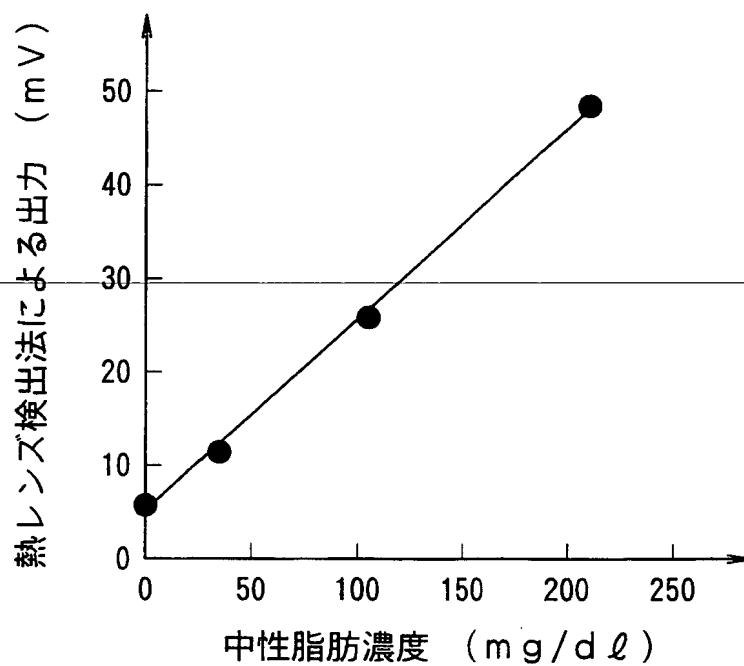
第28図



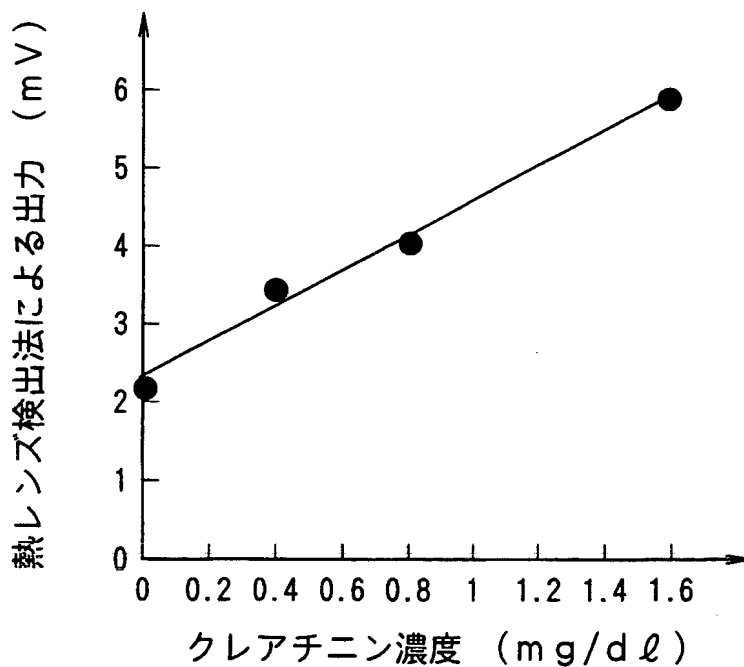




第29図

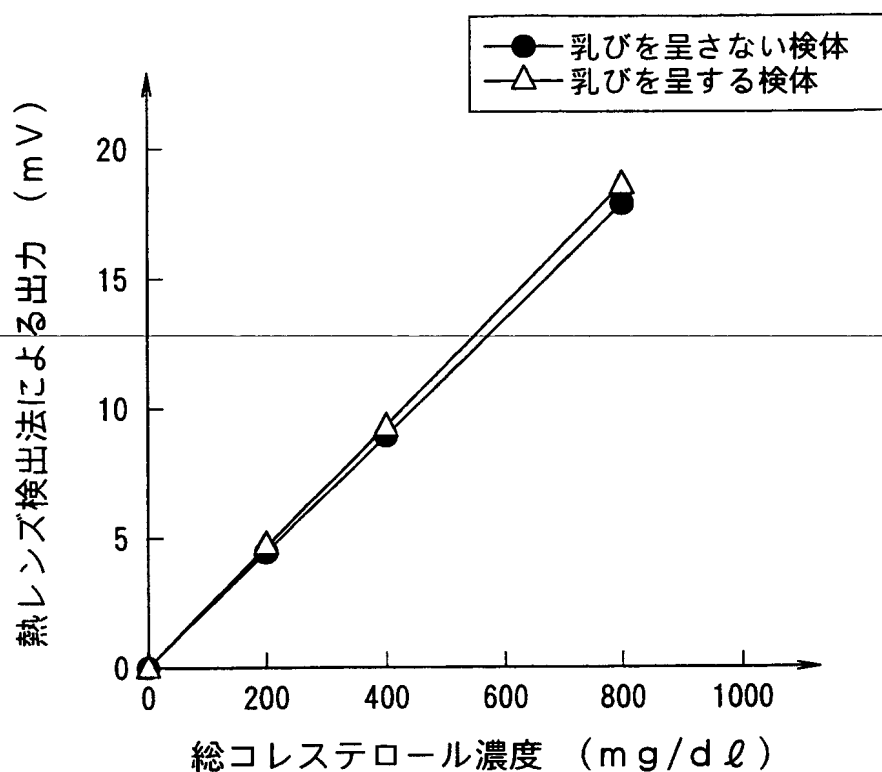


第30図

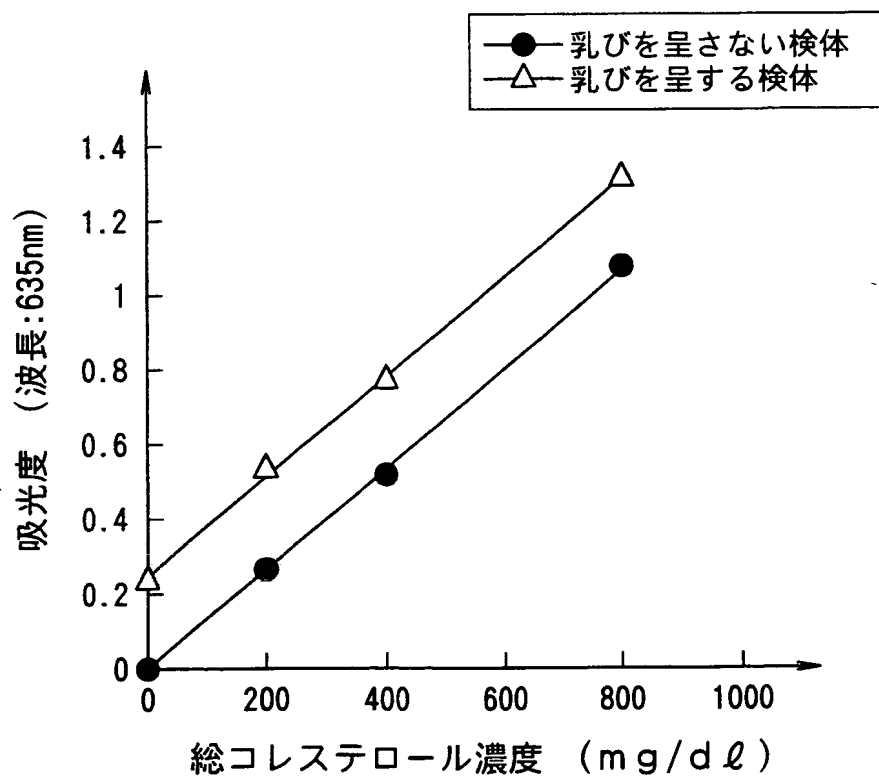




第31図



第32図





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04792

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-142177, A (Bunshi Bio Photonics Kenkyusho K.K.), 29 May, 1998 (29.05.98), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	1-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
14 September, 2000 (14.09.00)Date of mailing of the international search report  
26 September, 2000 (26.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> G 01N 25/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2000年  
日本国登録実用新案公報 1994-2000年  
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-142177, A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 29. 5月. 1998 (29. 05. 98) 全文, 図1-4 (ファミリーなし)	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
14. 09. 00

国際調査報告の発送日  
26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
野村 伸雄



2 J 9311

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

